

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

B851e      Bride, Lais de Lima, 1991 -  
Epidemiologia molecular e caracterização da resistência e  
virulência de amostras de *Staphylococcus aureus* provenientes  
de hospitais da Grande Vitória – ES / Lais de Lima Bride – 2015.  
116 f. : il.

Orientador: Ricardo Pinto Schuenck.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Virulência. 3. Técnicas de  
Genotipagem. 4. MRSA. I. Schuenck, Ricardo Pinto.  
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**LAIS DE LIMA BRIDE**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA E  
VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PROVENIENTES  
DE HOSPITAIS DA GRANDE VITÓRIA – ES**

VITÓRIA

2015

**LAIS DE LIMA BRIDE**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA E  
VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PROVENIENTES  
DE HOSPITAIS DA GRANDE VITÓRIA – ES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo P. Schuenck

VITÓRIA

2015

**LAIS DE LIMA BRIDE**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA E  
VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PROVENIENTES  
DE HOSPITAIS DA GRANDE VITÓRIA – ES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 27 de abril de 2015

**Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientador**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Imbroisi Valle Errera**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Giambiagi de Marval**  
**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

VITÓRIA

2015

## DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a Deus e a espiritualidade maior por me concederem a vida e me conduzirem nesta jornada.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Leonardo e Diana, meus principais alicerces, por me amar incondicionalmente e se dedicar a mim da maior e melhor forma possível em todos os dias da minha vida. Sendo meu pai minha maior referência de caráter e benevolência e minha mãe meu maior exemplo de fibra e coragem!

Aos meus irmãos, Felipe o meu protetor e Daniel o meu protegido, por me amar e me aceitar como sou, além de respeitar e apoiar todas as minhas decisões, torcendo pelo meu sucesso e minha felicidade hoje e sempre.

Ao Pedro, meu namorado e verdadeiro companheiro, por todo amor e compreensão e por nunca ter medido esforços para me ajudar e me apoiar sempre que necessário.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo P. Schuenck que acreditou na minha capacidade de realizar este trabalho, me fornecendo grande crescimento profissional ao se mostrar sempre disposto a me ensinar e me instruir, além de ter se dedicado verdadeiramente pela qualidade desta obra.

Aos meus colegas do LabCAS e do Resbac, Geraldo, Maralisi, Nayara, Umberto, Ana Carolina e Mayara, por estarem sempre dispostos a me auxiliar na preparação e realização dos experimentos além de terem se mostrado verdadeiros amigos dispostos a me ouvir e me ajudar quando necessário.

Às técnicas do setor de microbiologia ao serem extremamente solícitas nos momentos em que precisei de ajuda para a realização do meu trabalho e também por terem dividido comigo tantos risos, conversas e cafezinhos de fim de tarde.

Às professoras Ana Paula e Liliana por terem cedido diversas vezes a estrutura física e os equipamentos necessários para a realização dos experimentos.

À minha família e aos meus verdadeiros amigos: muito obrigada por todo carinho, amizade e torcida pelo meu sucesso!

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia eu agradeço imensamente pela oportunidade.

A CAPES, FAPES e CNPq muito obrigada por tornar este trabalho realidade!

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é o patógeno mais frequente em casos de infecções associadas aos cuidados de saúde no Brasil e no mundo. Devido à sua grande capacidade de produzir diferentes fatores de virulência, este microrganismo está associado a diversos tipos de infecções e doenças de gravidades variáveis. O objetivo deste estudo foi analisar aspectos relacionados à virulência, resistência aos antimicrobianos e epidemiologia molecular de 100 amostras de *S. aureus* provenientes de cinco hospitais da Grande Vitória-ES. Através do teste de difusão a partir do disco, foi verificado um índice de resistência superior a 50% aos fármacos comumente utilizados na prática clínica, como: eritromicina, ciprofloxacina e clindamicina. Através da detecção do gene *mecA*, foram identificadas 41 amostras de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) e 59 resistentes (MRSA). Dentre estas amostras de MRSA, 29 apresentaram o SCC*mecII*, 19 o SCC*mecIV* e outras 11 foram “não tipáveis”. Os genes de virulência mais prevalentes foram: *ebpS* (78 amostras) e *fnbA* (44). O gene que codifica a leucocidina de Panton-Valentine foi encontrado em 22 amostras. As amostras de MSSA apresentaram, significativamente, mais genes de virulência de adesinas que as amostras de MRSA. A análise genotípica através do perfil de fragmentação do DNA cromossômico com enzima de restrição das 59 amostras de MRSA revelou a presença de oito genótipos distintos, sendo dois prevalentes: genótipo A (37 amostras), que incluiu todas as amostras com o SCC*mecII* e o genótipo B (15 amostras), composto apenas por amostras com o SCC*mecIV*. As amostras albergando o SCC*mecIV* apresentaram uma maior diversidade genotípica ao estarem distribuídas em sete genótipos distintos, indicando uma possível origem policlonal das mesmas. O perfil de virulência dos dois genótipos dominantes mostrou-se específico, havendo predomínio do gene *ebpS* no genótipo A e dos genes *fnbB* e *lukS-F* no genótipo B. Isto pode refletir a capacidade de determinados genes em se inserirem em linhagens específicas. Esse pequeno número de genótipos circulantes nos hospitais estudados indica a necessidade de melhorias no sistema de vigilância e a adoção de medidas eficazes de controle que evitem a disseminação intra-hospitalar destas linhagens.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Resistência. Virulência. Genotipagem.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is the most common pathogen involved in healthcare-associated infections in Brazil and world. Because of the large ability to produce many virulence factors this microorganism is associated with several cases of infections and diseases with severity variable. The aim of this present study is to analyze aspects like virulence, antimicrobial resistance and molecular epidemiology of 100 *S. aureus* isolates, coming from five hospitals in Grande Vitória - ES. Using the disc diffusion method was observed a resistance rate above 50% to antimicrobials often used in clinical routine like erythromycin, ciprofloxacin and clindamycin. The gene *mecA* detection identified 41 methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and 59 methicillin-resistant (MRSA), including 29 MRSA SCC*mec* type II, 19 SCC*mec*IV and 11 non-typeable MRSA strains. The most prevalent virulence genes in our study were *ebpS* (78 strains) and *fnbA* (44 strains). The gene encoding the Panton-Valentine leukocidin (PVL) was detected in 22 isolates. The MSSA strains showed, significantly, more virulence genes related with adhesins expression than MRSA strains. The genotypic analysis of the chromosomal DNA fragmentation profile with restriction enzyme in 59 MRSA strains reveal the presence of eight different genotypes, being two prevalent: the genotype A (37 isolates) which includes all SCC*mec*II strains and the genotype B contains only SCC*mec*IV strains. The SCC*mec*IV isolates showed a greater genotypic diversity, being distributed in seven different genotypes which indicates possible polyclonal origin. The virulence profile of the two dominant genotypes was shown to be specific due to gene *ebpS* predominance in genotype A and genes *fnbB* and *lukS-F* predominance in genotype B. This can reflect the certain genes capacity to insert in some specific lineages. The small number of circulating lineages in studied hospitals indicates the need for improvements in surveillance systems as also in adoption of effective control measures which prevents the dissemination of these lineages between hospitals.

Key-words: *Staphylococcus aureus*. Resistance. Virulence. Genotyping.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Staphylococcus aureus</i> em três situações distintas.....	01
<b>Figura 2.</b> Principais fatores de virulência encontrados em <i>Staphylococcus aureus</i> ..	08
<b>Figura 3.</b> Fórmulas estruturais dos antimicrobianos beta-lactâmicos originados a partir da penicilina.....	12
<b>Figura 4.</b> Estrutura dos 11 tipos de cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> ) descritos em <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
<b>Figura 5.</b> Estrutura básica do cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> ).....	15
<b>Figura 6.</b> Prevalência mundial de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina em casos de infecções hospitalares.....	22
<b>Figura 7.</b> Foto ilustrativa da eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados para caracterização dos tipos de SCC <i>mec</i> .....	47
<b>Figura 8.</b> Foto ilustrativa da eletroforese de campo pulsado (PFGE) evidenciando os padrões de fragmentação do DNA cromossômico das amostras <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina.....	58

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de infecções primárias de corrente sanguínea em pacientes adultos hospitalizados em 908 unidades de terapia intensiva de janeiro a dezembro de 2013.....	05
<b>Gráfico 2.</b> Taxas de resistência à oxacilina em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de infecções primárias de corrente sanguínea por região geográfica em pacientes em terapia intensiva durante o período de 2006 a 2008.....	16
<b>Gráfico 3.</b> Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 100 amostras <i>Staphylococcus aureus</i> analisadas.....	46
<b>Gráfico 4.</b> Tipos dos cassetes cromossômicos estafilocócicos <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> ) detectados nas 59 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilicina.....	47
<b>Gráfico 5.</b> Presença dos genes de virulência investigados nas 100 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> do presente estudo.....	53
<b>Gráfico 6.</b> Comparação da presença dos genes de virulência nas amostras <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilicina (MRSA) em relação às amostras <i>Staphylococcus aureus</i> sensíveis à metilicina (MSSA).....	54
<b>Gráfico 7.</b> Frequência da presença dos genes de virulência testados nas 59 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilicina (MRSA) de acordo com os tipos de cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> ) detectados.....	55
<b>Gráfico 8.</b> Genótipos das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilicina obtidos por meio da análise do padrão de fragmentação do DNA cromossomal e separação por eletroforese de campo pulsado (PFGE).....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Linhagens dos principais complexos clonais de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina e sua distribuição mundial.....	25
<b>Tabela 2.</b> Seqüência nucleotídica, tamanho do amplicon e especificidade dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR-multiplex para tipagem do cassette cromossômico <i>mec</i> das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina.....	36
<b>Tabela 3.</b> Oligonucleotídeos, genes de virulência investigados associados à expressão de adesinas, e seus respectivos tamanhos de fragmentos gerados.....	38
<b>Tabela 4.</b> Oligonucleotídeos, genes de virulência investigados associados à expressão de toxinas, e seus respectivos tamanhos de fragmentos gerados.....	40
<b>Tabela 5.</b> Instituições de saúde e fontes de isolamento das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> analisadas no presente estudo.....	45
<b>Tabela 6.</b> Perfil de resistência aos antimicrobianos não beta-lactâmicos em relação aos tipos de SCC <i>mec</i> das amostras <i>Staphylococcus aureus</i> do presente estudo...	49
<b>Tabela 7.</b> Significância estatística da resistência aos antimicrobianos não-betalactâmicos comparando os grupos de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes ou sensíveis à meticilina.....	50
<b>Tabela 8.</b> Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI <sub>s</sub> ) de oxacilina e vancomicina das 100 amostras clínicas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	51
<b>Tabela 9.</b> Perfil de susceptibilidade das sete amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> albergando o gene <i>mecA</i> e que mostraram-se sensíveis à oxacilina pelos testes fenotípicos.....	52
<b>Tabela 10.</b> Comparação entre os métodos utilizados para a detecção da resistência à oxacilina nas 100 amostras deste estudo.....	52
<b>Tabela 11.</b> Presença dos genes de virulência de acordo com o perfil de resistência à meticilina das 100 amostras <i>S. aureus</i> estudadas.....	55
<b>Tabela 12.</b> Significância estatística da prevalência dos genes de virulência comparando os grupos de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes e sensíveis à meticilina.....	56
<b>Tabela 13.</b> Correlação entre os genótipos encontrados e o perfil de virulência das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC – Coleção de Microrganismos Norte Americana (do inglês *American Type Culture Collection*)
- CA-MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina adquiridos na comunidade (do inglês *community-acquired* MRSA)
- CC – complexo clonal
- CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
- CLSI – Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*)
- CMI – concentração mínima inibitória
- DNA - ácido desoxirribonucleico
- EGM - elemento genético móvel
- EUA - Estados Unidos da América
- HABF - Hospital Antônio Bezerra de Farias
- HA-MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina associados aos cuidados de saúde (do inglês *hospital-acquired* MRSA)
- HUCAM - Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes
- IPCS - infecção primária da corrente sanguínea
- IRAS - infecções relacionadas à assistência de saúde
- LCS - lesões cutâneas e secreções diversas
- MLST – tipagem por sequenciamento de multilocus (do inglês *multilocus sequence typing*)
- MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (do inglês *methicillin resistant Staphylococcus aureus*)
- MSCRAMM – moléculas adesivas da matriz reconhecedoras de componentes da superfície (do inglês *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*)
- MSSA - *Staphylococcus aureus* sensíveis à metilicina (do inglês *methicillin sensitive Staphylococcus aureus*)
- PBP – proteína ligante de penicilina (do inglês *penicillin binding protein*)
- PBP2a - proteína ligante de penicilina 2a (do inglês *penicillin-binding protein 2<sup>a</sup>*)
- PCR - reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

PFGE - eletroferese em campo pulsado (do inglês *pulsed field gel electrophoresis*)

PVL – leucocidina de Panton-Valentine

Rede RM - Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços da Saúde

*S. aureus* - *Staphylococcus aureus*

SCC*mec* - cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*)

SCN - *Staphylococcus* coagulase negativa

SCP - *Staphylococcus* coagulase positiva

ST – tipo de sequencia (*sequence type*)

*Staphylococcus* CoN - *Staphylococcus* coagulase negativa

*Staphylococcus* spp. – espécies do gênero *Staphylococcus*

SUS - Sistema Único de Saúde

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

UTI – unidade de terapia intensiva

VISA - *Staphylococcus aureus* de resistência intermediária à vancomicina (*Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*)

VRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (do inglês *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*)

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - por cento

° - graus

°C – graus Célsius

μm – micrômetro

g - aceleração

h – horas

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>O – água

Kb – kilobase

M – molar

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

O<sub>2</sub> – gás oxigênio

p/v – partes por volume

pb – pares de base

pH – potencial hidrogeniônico

U – unidade de medida

UFC/mL – unidades formadoras de colônia por mililitro

V – voltz

V/cm – voltz por centímetro

v/v – volume por volume

μg/mL – micrograma por mililitro

μL – microlitro

μM – micromolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1	Gênero <i>Staphylococcus</i> spp.....	01
1.2	Infecções relacionadas à assistência a saúde causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	03
1.3	Principais fatores de virulência produzidos por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	07
1.4	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA).....	11
1.5	Infecções causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina adquiridos na comunidade.....	19
1.6	Epidemiologia das infecções causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina.....	22
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1	Objetivo geral.....	27
3.2	Objetivos específicos.....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
4.1	Locais de isolamento das amostras.....	28
4.2	Amostras bacterianas.....	30
4.2.1	Aspectos éticos e legais.....	30
4.2.2	Identificação das amostras bacterianas.....	30
4.3	Testes de susceptibilidade e sensibilidade a antimicrobianos.....	32
4.4	Liberação do DNA bacteriano.....	34
4.5	Tipagem do cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> )....	36
4.6	Deteção de genes de virulência associados à expressão de adesinas.....	38
4.7	Deteção de genes de virulência associados à expressão de toxinas.....	40
4.8	Análise do padrão de fragmentação do DNA cromossômico das amostras com uso da enzima de restrição <i>Sma</i> I e separação em gel por eletroforese de campo pulsado (PFGE).....	42
4.9	Análises estatísticas.....	44

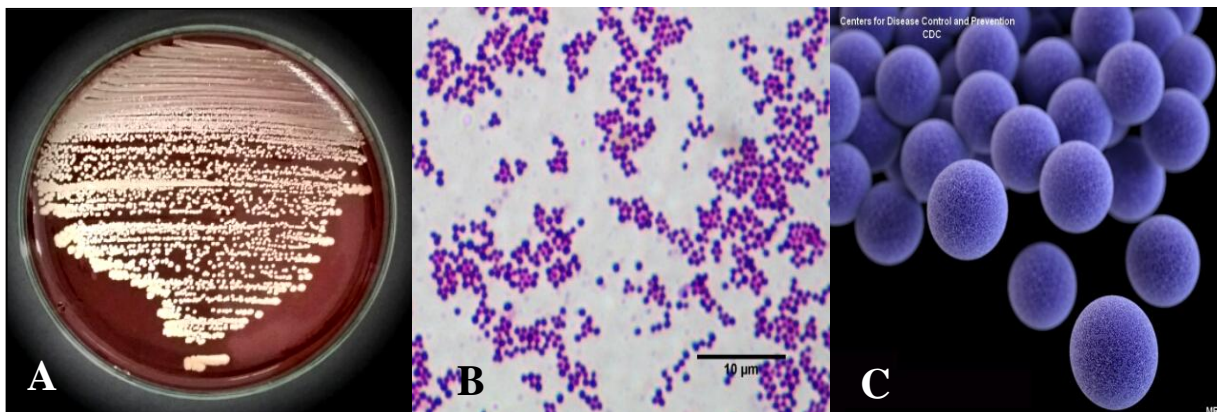
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
5.1	Amostras bacterianas e fontes de isolamento.....	45
5.2	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	46
5.3	Tipagem do cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> )....	47
5.4	Comparação da susceptibilidade aos antimicrobianos não beta lactâmicos entre as amostras de MRSA e MSSA.....	48
5.5	Determinação da concentração mínima inibitória de oxacilina e vancomicina.....	51
5.6	Deteção de genes de virulência.....	53
5.7	Genotipagem das amostras de MRSA a partir da análise do padrão de fragmentação do DNA cromossômico após uso de enzima de restrição e visualização por eletroforese de campo pulsado (PFGE).....	57
5.8	Relação entre os genótipos de MRSA detectados e a presença dos genes de virulência.....	59
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>73</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O gênero *Staphylococcus*

*Staphylococcus* é um gênero bacteriano composto por cocos Gram-positivos cuja nomenclatura advém do grego *staphylé* – em português “cachos de uvas” – devido ao estado agrupado em que são visualizados microscopicamente, mas também podem ser verificados na forma isolada ou dispostos em pares e trios. As colônias crescidas em meio de cultura sólido medem, geralmente, de 1 a 2 mm de diâmetro, apresentam formato arredondado, textura cremosa e coloração variável entre cinza a amarelo-ouro (BANNERMAN & PEACOCK, 2007), como pode ser observado Figura 1.



**Figura 1.** *Staphylococcus aureus* em três situações distintas. **A:** semeadura em ágar sangue. Fonte: Lais Bride, Laboratório de Biologia Molecular e Resistência Bacteriana; **B:** coloração de Gram visualizada em microscopia óptica. Fonte: Wistreich, 2011; **C:** células observadas por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov), 2015.

As espécies deste gênero são imóveis, medem entre 0,5 e 1,0 µm, podendo ser aeróbias ou anaeróbias facultativas, possuem capacidade de crescer em meios de cultura contendo até 10% de cloreto de sódio e temperatura variável entre 18 a 40°C, sendo 30 a 37 °C a temperatura ótima para crescimento (MURRAY *et al.*, 2004). Essas características permitem que essas espécies colonizem facilmente diferentes locais, como a água, o solo, alimentos e também animais, especialmente

os mamíferos, destacando-se o ser humano, cujas regiões comumente colonizadas são: epiderme e membrana mucosa (GORBACH, 1996).

Composto, atualmente, por 51 espécies e 27 subespécies (LPSN, 2015) o gênero *Staphylococcus* pode ser dividido em dois grandes grupos baseados na produção da enzima coagulase: *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). A enzima coagulase atua na conversão do fibrinogênio sanguíneo em fibrina, assim, permite que os SCP coagulem o plasma sanguíneo do hospedeiro (OTTO, 2010).

O grupo dos SCN corresponde à maioria das espécies do gênero e fazem parte da microbiota comensal da pele e da mucosa dos humanos. Nestes sítios, as principais espécies encontradas são: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. lugdunensis* entre outras espécies que também são comumente associadas a infecções humanas (CHANG *et al.*, 2003; ROSS *et al.*, 2005; SINGHAL *et al.*, 2006). Dentre todas as espécies do grupo SCN, os *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* são os agentes mais frequentes em infecções, especialmente septicemia (CASEY *et al.*, 2007; BRITO *et al.* 2014). Um estudo realizado por BRITO *et al.* (2007) em culturas de sangue em uma unidade de terapia intensiva (UTI) neonatal do Hospital Universitário de Uberlândia demonstrou que os SCN corresponderam a 68,8% dos casos, sendo que 97,7% destes SCN foram *S. epidermidis* e 2,3% *S. haemolyticus*.

Um estudo realizado por ALMEIDA *et al.* (2014) que investigou 125 casos de infecções em um hospital público no Rio Grande do Norte revelou que *Staphylococcus* spp. correspondia a maioria (68%) dos casos, ao passo que *Staphylococcus aureus*, foi a espécie bacteriana mais frequente, sendo encontrado em 20% das infecções. Mesmo que a maioria do gênero *Staphylococcus* seja composto por espécies de SCN, esse e outros estudos evidenciam que *S. aureus* é a espécie bacteriana mais importante deste gênero devido à sua importância clínica.

## **1.2 Infecções relacionadas à assistência a saúde causadas por *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* subespécie *aureus* (*S. aureus*) é reconhecido como o maior representante do seu gênero por ser o patógeno mais frequente em casos de infecções associadas aos cuidados de saúde (IRAS) no Brasil e no Mundo (GREEN *et al.*, 2012).

Devido à produção de carotenóides, as colônias de *S. aureus* apresentam uma cor amarelo-ouro, dando origem à sua nomenclatura: “estafilococo dourado”. Esta espécie de SCP faz parte da microbiota normal de 30% da população humana como residente assintomático (ARCHER, 1998). Em indivíduos portadores de *S. aureus*, a narina anterior é o sítio mais frequentemente colonizado, funcionando como um reservatório primário para este microrganismo (CASEWEL & HILL, 1986). Outros sítios também podem ser colonizados em menor frequência, como pele, axilas, vagina e períneo; a partir desses sítios os *S. aureus* podem colonizar outras regiões (SCANVIC *et al.*, 2001).

São comuns os casos de infecções endógenas causadas por *S. aureus*, todavia, outras pessoas também podem desenvolver infecções pela aquisição desta bactéria de indivíduos portadores ou de fontes ambientais. Frequentemente, a transmissão deste microrganismo resulta da colonização transitória das mãos e da aspiração de aerossóis de secreções nasais (BANNERMAN, 2003). Nesse sentido, indivíduos portadores de *S. aureus* podem transferi-los para pessoas em diversos ambientes distintos, especialmente, no interior das instituições de saúde através da contaminação entre pacientes e de profissionais para pacientes (BOYCE, 1996).

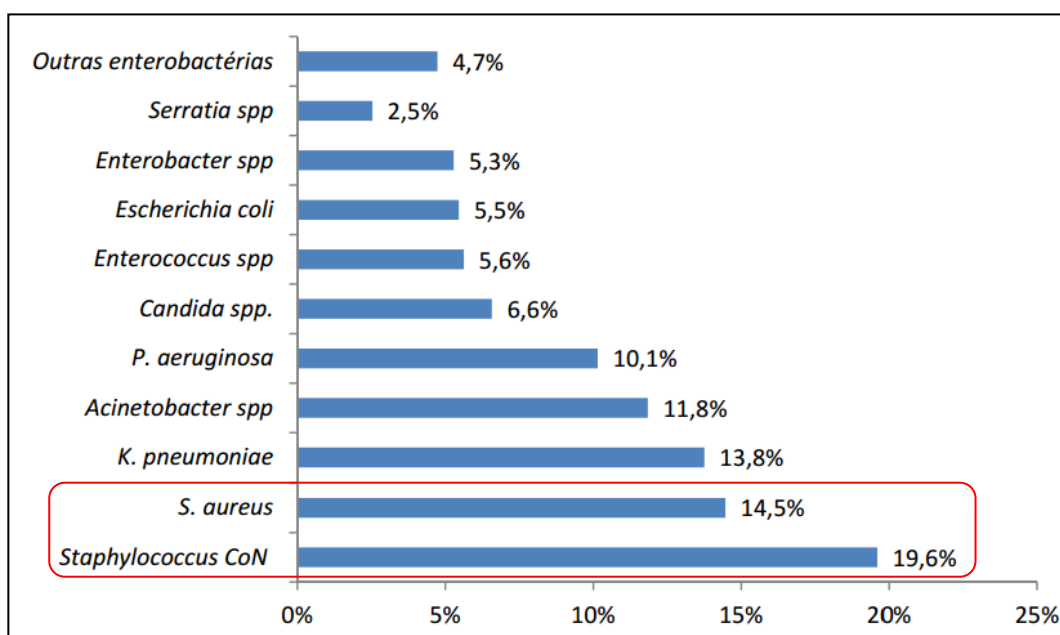
Por se tratar de uma bactéria potencialmente patogênica, existe a possibilidade de uma colonização comensal tornar-se uma infecção, sobretudo em indivíduos com desequilíbrio imunológico, fato que se torna preocupante, pois as infecções causadas por *S. aureus*, comumente, induzem o desenvolvimento de diversas doenças, podendo até mesmo levar um indivíduo a óbito (DELEO *et al.*, 2010).

Reconhecido como o causador mais comum de infecções em humanos desde 1883 (OGSTON, 1883), *S. aureus* é associado a diversos tipos de infecções de gravidade

variável, desde celulites, foliculites, furúnculos a até mesmo bacteremias, endocardites, pneumonia, abscessos cerebrais entre outros (SMITH & JARVIS, 1999). Além disso, devido à sua grande capacidade de produzir toxinas, este microrganismo também pode causar doenças como síndrome do choque tóxico, intoxicações alimentares e síndrome da pele escaldada (BUKOWSKI *et al.*, 2010).

Frequentemente, os *S. aureus* são isolados a partir de infecções de feridas cirúrgicas, que podem representar focos para desenvolvimento de infecções sistêmicas. Além disso, por ser um microrganismo comensal da microbiota da epiderme, pacientes que fazem uso de cateteres endovenosos estão sujeitos à infecção por *S. aureus* por meio de sua invasão a partir do local de inserção do cateter. Consequentemente, este microrganismo pode alcançar a circulação sanguínea, gerando graves quadros de bacteremia, que por sua vez podem causar infecções em sítios anatômicos distantes (secundários), como endocardites, osteomielites, artrites, além da formação de abscessos na pele, tecidos subcutâneos, pulmões, fígado, rins, cérebro entre outros (BANNERMAN, 2003; CAVALCANTI *et al.* 2005; GOSBELL, 2005).

Atualmente, *S. aureus* é a espécie bacteriana mais frequente em diferentes casos de infecções hospitalares tanto no Brasil quanto em outros países da América Latina e dos demais continentes. Estudos de vigilância epidemiológica nacionais evidenciam que este patógeno é responsável por grande parte das IRAS em nosso país. Um estudo realizado em 2014 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços da Saúde (Rede RM), o qual investigou 18.233 casos de infecção primária da corrente sanguínea (IPCS) em 908 UTIs do Sistema Único de Saúde (SUS) observou que do total de casos estudados, os *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) mostraram-se a maioria, entretanto, *S. aureus* foi a espécie bacteriana mais frequente, estando presente em 14,5% dos pacientes, conforme demonstrado no Gráfico 1.



**Gráfico 1.** Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de infecções primárias de corrente sanguínea em pacientes adultos hospitalizados em 908 unidades de terapia intensiva de janeiro a dezembro de 2013. Fonte: Rede RM, 2014.

Assim como no Brasil, outros países dos demais continentes também sofrem com a alta incidência dos *S. aureus* em casos de IRAS: um recente estudo epidemiológico realizado em um hospital nos Estados Unidos da América (EUA) analisou a prevalência do *S. aureus* em infecções diversas de 400 pacientes internados em um hospital de Ohio, onde foi confirmada a alta prevalência deste agente, estando presente em 25% dos casos investigados (KAPOOR *et al.*, 2014). De modo similar, o estudo de YH *et al.* (2015) revelou que os *S. aureus* eram responsáveis por 39% dos casos de infecções de pele e tecidos moles em um hospital no Taiwan. Segundo o estudo de CHAHOUD *et al.* (2014) os *S. aureus* são responsáveis por cerca de 12 a 65% dos casos de infecção de sítio cirúrgico no Líbano. Em um estudo prospectivo realizado por BONNAL *et al.* (2015), também foi evidenciado que *S. aureus* é o principal causador de bacteremia associada aos cuidados de saúde na França, sendo detectado em 18% dos casos analisados.

Em todo o mundo, milhares de pacientes são acometidos por infecções causadas por *S. aureus*, o que gera altas taxas de morbidade e mortalidade. Além disso, estas infecções causam um aumento do tempo de permanência hospitalar e a elevação

dos custos de tratamento, sobretudo quando são causadas por cepas multirresistentes (CASEY *et al.*, 2007).

Em geral, as taxas de mortalidade relacionadas à infecção hospitalar variam conforme a topografia, a doença de base, etiologia, entre outros fatores. É estimada a ocorrência de grande variação nos coeficientes de letalidade por infecção hospitalar no Brasil, chegando a 40% em casos de infecções de corrente sanguínea, segundo estudo multicêntrico realizado em hospitais brasileiros (MARRA *et al.* 2011). Um estudo realizado por GUIMARÃES *et al.* (2011) investigou a incidência de óbitos associados à infecção hospitalar em um hospital de São Paulo e revelou que *S. aureus* foi a espécie bacteriana responsável pela maioria dos óbitos, correspondendo a 25% dos casos, todos correlacionados à pneumonia e sepse. Do mesmo modo, estudos similares realizados nos EUA revelam que 11 a 43% das infecções hospitalares causadas por *S. aureus* são letais, especialmente em casos de pneumonia e sepse (RAGLE, 2010).

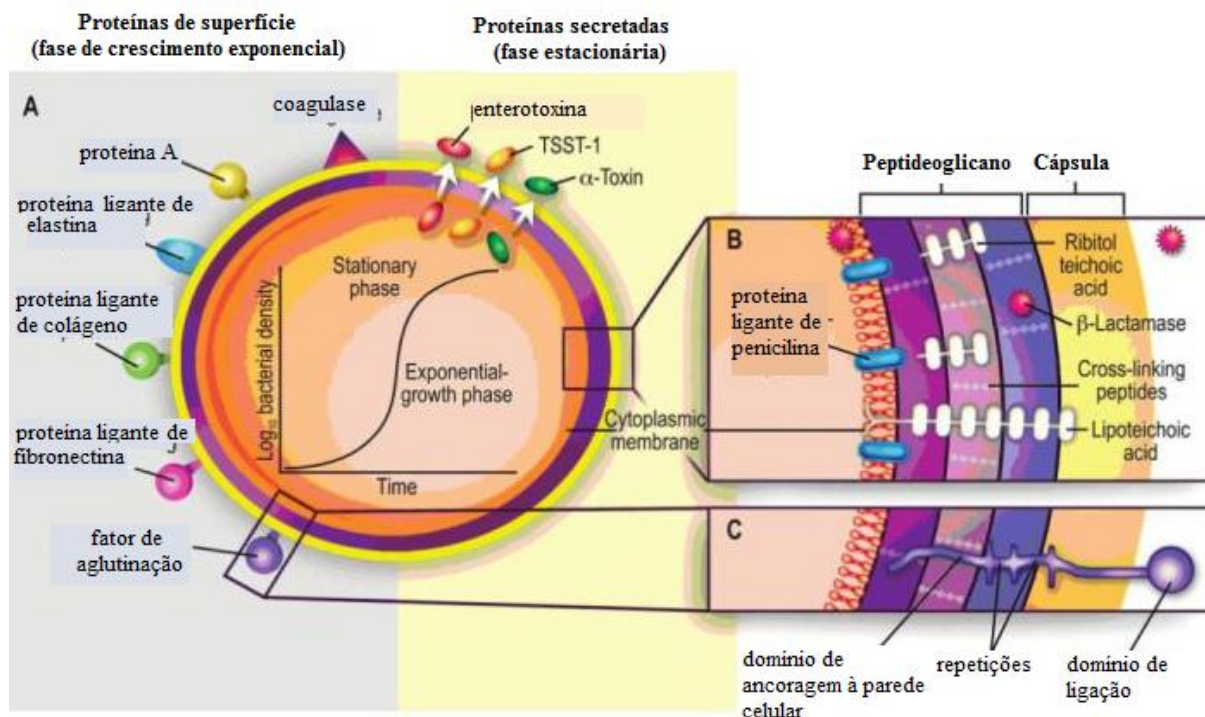
No estudo de NULENS *et al.* (2008) foi realizada uma comparação dos custos do tratamento de bacteremias causadas por *S. aureus* em relação aos custos da adoção de medidas preventivas e pró-ativas de controle de infecção. Esse trabalho demonstrou que o gasto com o tratamento das infecções foi duas vezes maior que os gastos com as medidas de controle.

### 1.3 Principais fatores de virulência produzidos por *Staphylococcus aureus*

A versatilidade dos *S. aureus* em gerar infecções de gravidades variáveis decorre do grande espectro de fatores de virulência codificados em seu genoma. Assim, ao infectar um organismo vivo é crucial que estas bactérias possuam mecanismos moleculares que permitam a adesão, a colonização e a invasão no hospedeiro, além da fuga do sistema imune do mesmo. Tais mecanismos são desempenhados pelos fatores de virulência, os quais podem ser enzimas, toxinas, proteínas estruturais de superfície celular, entre outras (MURRAY, *et al.* 2004; FOSTER, 2005).

Doenças associadas aos *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta ao tecido através de cortes, da infecção primária da corrente sanguínea ou da produção de toxinas. Além disso, esse microrganismo também é capaz de causar infecções secundárias, isto é, alcançar outros sítios além daquele já infectado (SCHECHTER *et al.*, 1998; ANDRIOLO, 2005; IWATSUKI *et al.*, 2006).

As adesinas são proteínas capazes de aderir às células do hospedeiro por meio da associação com os componentes da matriz extracelular do mesmo (Figura 2). Representadas pela sigla MSCRAMMs (do inglês: “*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*”), algumas adesinas também atuam como invasinas, promovendo a entrada dos *S. aureus* em outros tecidos ao ligarem-se a proteínas presentes no plasma sanguíneo do hospedeiro, como fibronectina A, fibronectina B, colágeno, elastina e ácido siálico ósseo. Dessa forma, o conjunto de MSCRAMMs expressos em amostras de *S. aureus* permite que determinadas cepas causem tipos específicos de infecções, tais como bacteremias, infecções associadas a dispositivos médicos e outras (FOSTER & HOOK, 1998; KANG *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Principais fatores de virulência encontrados em *Staphylococcus aureus*. Fonte: adaptado de GORDON & LOWY, 2008.

Além da coagulase, que através da conversão do fibrinogênio em fibrina é capaz de coagular o plasma sanguíneo, outras adesinas também demonstram importante papel na patogênese do processo infeccioso por *S. aureus*: a proteína de ligação ao colágeno (Cna), codificada no gene *cna*, permite a associação dos *S. aureus* ao colágeno presente nos tecidos do hospedeiro (KANG *et al.* 2013); a proteína de ligação à elastina (EbpS), expressa pelo gene *ebpS*, cuja função é mediar a ligação do patógeno à elastina presente na matriz extracelular das células teciduais de órgãos como pulmões, vasos sanguíneos e pele (PARK *et al.*, 1996); a proteína de ligação à sialoproteína óssea (Bbp), codificada pelo gene *bbp*, capaz de associar-se à matriz proteica do organismo hospedeiro, sendo este fator de virulência comumente associado à osteomielite (TESTONI *et al.*, 2011); proteínas ligadoras de fibronectina A (FnBPA) e B (FnBPB), codificadas pelos genes *fnbA* e *fnbB* respectivamente, também atuam como importantes invasinas ao possibilitarem entrada dos *S. aureus* em diversos tecidos, como o epitelial, endotelial, mamário, ósseo e outros. Esta invasão tecidual decorre de um processo semelhante à fagocitose, o qual envolve integrinas e rearranjos do citoesqueleto (GARZONI & KELLEY, 2009). Estudos mostraram que amostras portadoras do gene *fnbB* mutante



possuem menor capacidade de adesão e invasão durante o processo infeccioso, evidenciando a importância das FnBPs na patogênese estafilocócica (GREENE *et al.*, 1995; SINHA & HERRMANN, 2005).

Após a invasão do epitélio, os *S. aureus* produzem outros fatores de virulência que viabilizam a sua sobrevivência e proliferação no organismo do hospedeiro por meio de estratégias que burlam o sistema imunológico do mesmo, como a neutralização da fagocitose, a opsonização do complemento e a inibição das respostas imunes humoral e celular (SANTOS *et al.*, 2007). Assim, alguns fatores de virulência produzidos pelos *S. aureus* permitem a fuga do sistema imune do hospedeiro, a sua permanência no organismo, bem como a sua posterior migração para os demais tecidos (LOWY, 1998; VELÁZQUEZ-MESA, 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas recebem este nome por serem atuantes no sistema entérico (digestivo), assim, casos de gastroenterite, normalmente, estão associados à intoxicação alimentar por *S. aureus*, onde os principais sintomas no hospedeiro incluem: disfunção intestinal, vômito e dores abdominais (HENNEKINNE *et al.*, 2012). As principais enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D e E) são codificadas em genes detectados no cromossomo bacteriano (*seb* e *sec*), em bacteriófagos (*sed* e *see*) e plasmídeos (*sea*) (JOHNSON *et al.* 1991). Quando expressas, essas toxinas agem como superantígenos, pois ativam a proliferação dos linfócitos T sem que haja a necessidade do processamento do antígeno por meio de uma interação não-específica do MHC II (complexo maior de histocompatibilidade II) com os receptores das células T, induzindo assim a proliferação de citocinas que promovem a morte celular por apoptose, danificando o tecido do organismo hospedeiro (LIN *et al.*, 2010). Além de casos de gastroenterite, a enterotoxina C (SEC) tem sido reconhecida como promotora em casos de endocardites, sepse e lesões renais em infecções associadas a CA-MRSA (SALGADO-PABON *et al.*, 2013).

A toxina da síndrome do choque tóxico (TSST) codificada pelo gene *tsst* é o superantígeno mais famoso associado aos *S. aureus* por ser capaz de desencadear uma doença severa e potencialmente letal: a síndrome do choque tóxico (SCT). A TSST promove danos ao organismo hospedeiro através da indução da proliferação de interleucinas (IL-1 e IL-2), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) entre outras citocinas que causam sérios danos teciduais (WILSON *et al.*, 2011).

Toxinas esfoliativas ETA e ETB, codificadas nos genes *eta* e *etb*, são proteases que atuam na destruição dos desmossomas que unem as células da superfície da pele, assim, cepas produtoras dessas toxinas são comumente associadas a uma doença severa chamada síndrome da pele escaldada, caracterizada pelo aparecimento de eritemas ao redor da boca que se espalham, posteriormente, para todo o corpo. Assim, o surgimento dessas bolhas induz a formação de zonas esfoliadas (sem pele) que acabam ficando expostas a outros patógenos (BUKOWSKI *et al.*, 2010).

Uma das principais citotoxinas produzidas por *S. aureus* é a Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) (BARTELS *et al.*, 2007). A PVL é codificada pelos genes de virulência *lukS-PV* e *lukF-PV* que expressam os componentes S e F respectivamente. Esses, por sua vez, atuam de forma sinérgica na função de romper células do sistema imune como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células polimorfonucleares (SUPERSAC *et al.*, 1993). Devido ao papel citolítico da PVL, as infecções causadas por *S. aureus* portadores dos genes *lukS/F-PV* estão associadas a doenças como pneumonia necrosante, infecções cutâneas, entre outras (PREVOST *et al.* 1995).

Dessa forma, os diferentes tipos de toxinas produzidas por este microrganismo podem induzir diferentes respostas imunes em cada hospedeiro, de forma que isso determinará quais serão as manifestações clínicas do processo infeccioso, assim como o grau de severidade dos sintomas sistêmicos (IWATSUKI *et al.*, 2006).

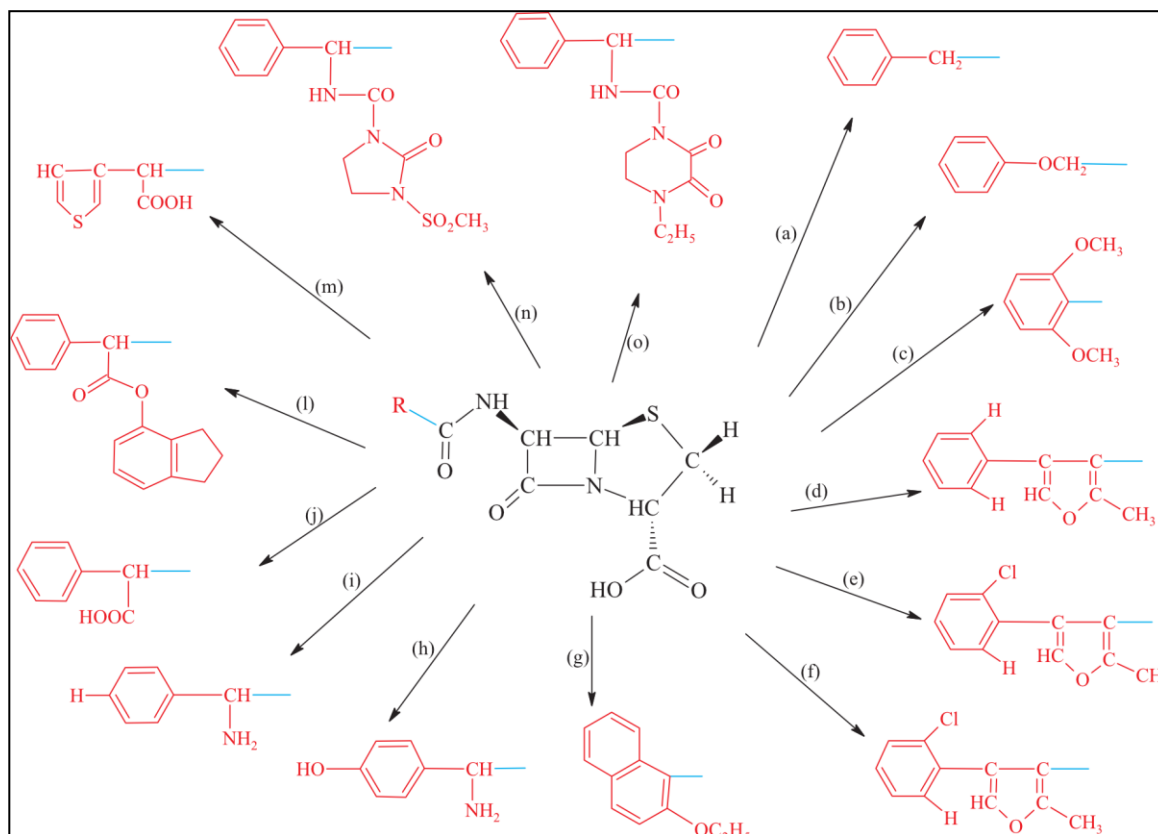
Em decorrência da rica variedade de fatores de virulência codificados no genoma das cepas de *S. aureus*, se torna muito difícil determinar um fator de virulência dominante, todavia, o conjunto dos diferentes mecanismos de virulência confere ao *S. aureus* uma versatilidade particular de gerar diferentes doenças tornando-o protagonista em estudos epidemiológicos associados aos cuidados a saúde (MONTANARO *et al.*, 2011).

#### 1.4 *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)

Durante a era pré-antibiótica, isto é, antes da descoberta da penicilina, a taxa de mortalidade em pacientes com bacterímia por *S. aureus* ultrapassava 80%, enquanto que mais de 70% das pessoas com infecções metastáticas morriam pela ação deste patógeno (COHEN, 1992).

O uso da penicilina no tratamento de infecções por *S. aureus* iniciou-se antes da década de 1940, entretanto, em decorrência da produção de beta-lactamases, (enzimas capazes de clivar o anel beta-lactâmico da penicilina) amostras resistentes à penicilina foram detectadas em hospitais e na comunidade por volta de 1942. (RAMMELKAMP & MAXON, 1942; BONDI & DIETZ, 1945). Dessa forma, no início da década de 1960, mais de 80% das infecções hospitalares causadas por *S. aureus* eram de cepas resistentes à penicilina (CHAMBERS, 2001).

A meticilina é um antimicrobiano beta-lactâmico semi-sintético pertencente ao grupo das penicilinas, sendo fabricada em 1959 no intuito de substituir o uso da penicilina, tendo em vista a grande incidência de cepas resistentes a este antimicrobiano. Contudo, poucos anos depois foram reportados casos de cepas resistentes à meticilina (JEVONS, 1961). O termo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é utilizado para identificar cepas resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos, representados na Figura 3 (NORIEGA *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Fórmulas estruturais dos antimicrobianos beta-lactâmicos originados a partir da penicilina. Estrutura básica no centro e cadeias laterais substituintes (em vermelho): (a) penicilina G; (b) penicilina V; (c) meticilina; (d) oxacilina; (e) cloxacilina; (f) dicloxacilina; (g) nafcilina; (h) amoxicilina; (i) ampicilina; (j) carbenicilina; (l) indanil-carbenicilina; (m) ticarcilina; (n) mezlocilina; (o) piperacilina. Fonte: Química Nova Interativa, 2015.

A resistência à meticilina é conferida pelo gene *mecA*, responsável pela expressão de uma proteína ligante de penicilina com conformação alterada, denominada PBP 2a (PBP2a – do inglês: “*penicillin-binding protein 2a*”) de 78 kDa (CHAMBERS, 1997).

A proteína ligante de penicilina é uma proteína de membrana que catalisa reações de transpeptidação, necessárias para as ligações cruzadas das cadeias de peptideoglicanos que compõem a parede celular bacteriana. Nesse sentido, o mecanismo de ação dos beta-lactâmicos advém da sua ligação com a PBP, bloqueando sua função vital às bactérias (GHUYSEN, 1994). Cepas de *S. aureus* que produzem PBP2a ao invés de PBP, conseguem livrar-se da ação dos beta-lactâmicos, uma vez que a conformação tridimensional alterada da PBP2a impede sua ligação a estes antimicrobianos (LIM & STRYNADKA, 2002).

O gene *mecA* está inserido em um elemento genético móvel encontrado apenas em amostras de MRSA, denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec* – do inglês: “*staphylococcal cassette chromosome mec*”) que está localizado próximo à origem de replicação dos *S. aureus*. Atualmente, existem descritos 11 tipos distintos de SCC*mec*, classificados do I ao XI (Figura 4), ([http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_TypesEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html), acessado em janeiro de 2015).

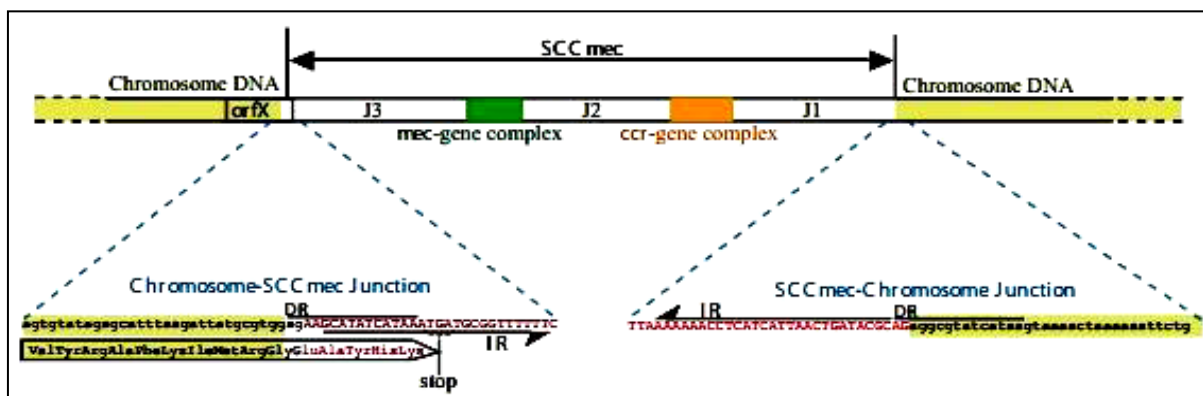
Além do gene *mecA*, o SCC*mec* também carrega os genes regulatórios *mecI* e *mecR1*, que codificam o indutor MecR1 e o repressor MecI que bloqueia a transcrição do gene *mecA*. Na presença de um antibiótico beta-lactâmico, MecR1 (transdutor de sinal transmembranar sensível a beta-lactâmicos) é automaticamente clivado e seu domínio metaloprotease, localizado no citoplasma, se tornando ativo, que por sua vez cliva a proteína repressora MecI, desativando-a e permitindo a transcrição do gene *mecA* e a subsequente produção da PBP2a (BERGER-BACHI & ROHRER, 2002).

Os tipos SCC*mec* mais comuns são do I ao VII, sendo que os tipos I (34,3 Kb), IV (20,9 – 24,3 Kb), V (28 Kb), VI (20,9 Kb) e VII (35,9 Kb) estão associados à resistência somente aos beta-lactâmicos, enquanto que os tipos II (53,0 Kb) e III (66,9 Kb) apresentam resistência a múltiplas classes de antimicrobianos em decorrência da presença genes de resistência a outros antimicrobianos inseridos neste segmento de DNA, isto é, elementos genéticos como plasmídeos (pUB110, pl128 e pT181) e transposons (Tn554 e Tn4001). O plasmídeo pUB110 possui o gene *ant(4')* que está associado à resistência de diversos aminoglicosídeos, como canamicina, trobamicina e bleomicina, enquanto o plasmídeo pl128 confere resistência à penicilina e metais pesados, inclusive mercúrio. O pT181 está associado a resistência à tetraciclina. Além disso, os variados tipos SCC*mec* carregam diversas sequencia de inserção, como a IS431 e IS1272, assim como carregam genes responsáveis pela regulação e transcrição do gene *mecA* (ITO *et al.*, 2001, 2004; DAUM *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006; TAKANO *et al.*, 2008).



Genes regulatórios inseridos no cassete cromossômico *mec* estão localizados nos chamados complexos *mec*, os quais são descritos cinco: do A ao E, sendo os complexos A e C os mais comuns (ITO *et al.*, 2003; KATAYAMA *et al.*, 2001).

Como pode ser observado na Figura 5, outros genes também são encontrados no SCC*mec*: genes de recombinases e invertases. Os genes *ccr* estão presentes em todos elementos SCC*mec*, sua função é integrar e excisar o SCC*mec* do genoma bacteriano em um sítio específico localizado na porção terminal 3' de uma sequência de leitura aberta (orf – do inglês: “*open reading frame*”) com função desconhecida. Nesse sentido, o tipo do SCC*mec* é determinado pelo complexo *mec* e pelos genes *ccr* apresentados. As regiões que não fazem parte dos complexos *mec* e nem dos genes *ccr* são chamadas de regiões J (do inglês: “*junkyard*”). Mesmo sendo amplamente disseminado entre os *S. aureus*, ainda não há pleno conhecimento sobre a origem dos SCC*mec* (HIRAMATSU *et al.*, 2001; KATAYAMA *et al.*, 2001; DAUM *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.* 2006).

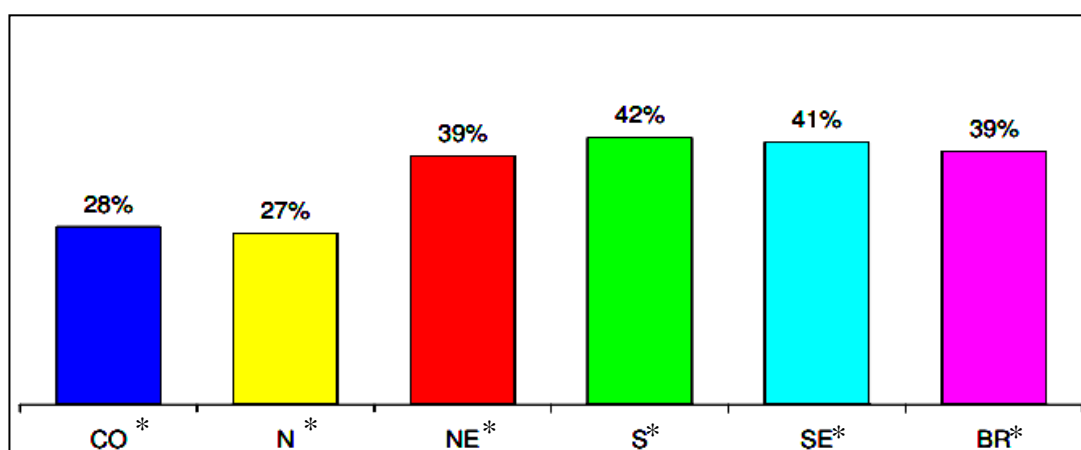


**Figura 5.** Estrutura básica do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*): repetições diretas (DRs) que contêm sequência do local de integração (ISS) reconhecidos pelas recombinases (CCR) com um par de repetições invertidas (IRs) presentes no final do cassete. Fonte: HIRAMATSU *et al.*, 2013.

Nos últimos anos, estudos realizados em cepas de MRSA, mas sem o gene *mecA* têm sido descobertas em populações humanas e bovinas na Inglaterra e Dinamarca. A resistência apresentada por estas cepas se deve a presença de um novo gene, nomeado *mecA*<sub>LGA251</sub>, mais conhecido como gene *mecC*, o qual apresenta 70% de homologia ao gene *mecA* convencional (GARCIA-ALVAREZ *et al.*, 2011). Apesar de as técnicas rotineiras de detecção de resistência aos antimicrobianos possam

identificar amostras portadoras do gene *mecC* resistentes à metilina, esta descoberta traz novos problemas na detecção de cepas de MRSA com o testes genotípicos comumente utilizados.

As taxas de resistência à metilina por *S. aureus* tem sido bastante variadas em diferentes países ao redor do mundo. Um estudo realizado em 2014 pela ANVISA através da Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços da Saúde (Rede RM) analisou casos de infecção primária da corrente sanguínea (IPCS). Estes casos foram investigados em 908 UTIs do Sistema Único de Saúde (SUS). Do total de casos, 2.637 pacientes estavam infectados por *S. aureus*, mostrando-se a espécie bacteriana mais presente, sendo a maioria de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA), correspondendo, aproximadamente, a 61% (1.606 pacientes). Outro estudo similar da Rede RM analisou 492 amostras *S. aureus* coletadas de pacientes com IPCS associada ao uso de cateteres venosos em 97 hospitais de todo o Brasil, durante o período de 2006 a 2008, verificou uma incidência de resistência à metilina entre 25 a 45% nas regiões do país, possuindo média nacional de 39%, conforme exibido no gráfico 2.



**Gráfico 2.** Taxas de resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* isolados de infecções primárias de corrente sanguínea por região geográfica em pacientes em terapia intensiva durante o período de 2006 a 2008, notificadas pelos Hospitais Colaboradores da Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços da Saúde (Rede RM). \*CO – região Centro-Oeste; N – região Norte; NE – região Nordeste; S – região Sul; SE – região Sudeste; BR – Brasil. Fonte: Rede RM, 2008.



Diante das altas taxas de resistência aos beta-lactâmicos, a utilização da vancomicina mostrou-se uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*. Este antimicrobiano é um glicopeptídeo, desenvolvido em 1956, entretanto, seu uso não foi imediato diante do sucesso da meticilina e de outros beta-lactâmicos para o tratamento de infecções por *S. aureus*. A vancomicina mostra-se uma alternativa terapêutica para o tratamento de MRSA apesar de seus efeitos nefrotóxicos e citotóxicos (SRINIVASAN *et al.*, 2002; LISBOA *et al.*, 2013).

O aumento no uso da vancomicina precedeu a emergência dos *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA – do inglês: “*vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*”), e posteriormente, dos *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA – do inglês: “*vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*”). A resistência a este fármaco resulta de mecanismos distintos, como por exemplo, pela aquisição de genes de resistência, como o operon *vanA*, transferido dos *Enterococcus faecalis*, por meio de conjugação entre as duas espécies bacterianas, ou pelo aumento na espessura da prede bacteriana devido à maior síntese de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina (mureína) (HANAKI *et al.*, 1998; CUI *et al.*, 2000; FRIDKIN, 2003).

A primeira amostra de VRSA foi descrita em 1997 por HIRAMATSU *et al.* no Japão. No Brasil, OLIVEIRA e colaboradores (2001) identificaram e publicaram as primeiras amostras de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) do país, em São Paulo. Neste estudo, cinco de 140 amostras de MRSA apresentaram resistência intermediária a este antimicrobiano, sendo quatro amostras oriundas de pacientes submetidos a tratamento com vancomicina por 30 dias. Mais recentemente, um estudo realizado por Rossi *et al.* (2014) com pacientes apresentando bacteremia, detectou a primeira amostra clínica de VRSA em nosso país. Essa amostra era um MRSA com SCC $_{mecIV}$  e ST 8 e, inicialmente, sensível a vancomicina, mas que adquiriu o gene de resistência *vanA* durante a antibioticoterapia e tornou-se resistente. Acredita-se que esta cepa tenha sido selecionada *in vivo* durante a administração do glicopeptídeo e outros antimicrobianos. Além do gene *vanA* também foi detectado o gene *aac* (que confere resistência a gentamicina) no mesmo plasmídeo chamado pBRZ01 que mostrou-se geneticamente semelhante ao plasmídeo Australiano (pWBG745) associado à cepas de *S. aureus* adquiridos na comunidade (CA-MRSA). Além disso, também

apresentou sequência idênticas à plasmídeos típicos de *Enterococcus faecalis* (ROSSI *et al.*, 2014).

O surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina traz grande preocupação em torno do seu uso e de outros antimicrobianos. Afinal, o tratamento terapêutico de infecções causadas por *S. aureus* ainda se mostra bastante limitado. Nos últimos anos, fármacos como linezolida, daptomicina e tigeciclina têm sido utilizados, entretanto, a vancomicina continua sendo o principal antimicrobiano utilizado, apesar de seus efeitos colaterais e toxicidade (HIRAMATSU *et al.*, 2001; ANSTEAD *et al.*, 2014).

É conclusivo que a evolução da resistência microbiana aos fármacos advém de múltiplos fatores, que inclui a dispersão de cepas resistentes e, às vezes, o uso inadequado e extensivo dos antimicrobianos. Além disso, o crescimento das viagens regionais e internacionais acaba por facilitar a dispersão mundial das bactérias multirresistentes. Dessa forma, este cenário se mostra alarmante, particularmente para *S. aureus*, em função da versatilidade deste patógeno.

### 1.5 Infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina adquiridos na comunidade

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as infecções por microrganismos podem ser classificadas como comunitárias ou relacionadas à assistência de saúde. Assim, infecção comunitária é aquela constatada ou em incubação no ato da admissão do paciente desde que não esteja relacionada com internação anterior ou com qualquer tratamento associado a instituições de saúde, assim, a infecção comunitária é aquela que está associada com complicação ou extensão de infecção já presente na admissão do paciente. Por outro lado, infecções relacionadas à assistência de saúde são adquiridas após a admissão do paciente, que se manifesta durante a internação ou após a alta e que pode ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. Nesse contexto, MRSA isolados a partir de infecções associadas aos cuidados de saúde são designados pela sigla HA-MRSA (do inglês: “*Hospital-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*”), ao passo que cepas de MRSA associadas a infecções comunitárias são representadas pela sigla CA-MRSA (do inglês: “*Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*”).

Diversos clones CA-MRSA têm se espalhado globalmente desde as últimas décadas, não somente na comunidade, mas também em instituições associadas aos cuidados de saúde. Em muitos casos, CA-MRSA são mais virulentos quando comparados aos HA-MRSA devido à presença de diversos fatores de virulência (CHAMBERS, 2001).

CA-MRSA e HA-MRSA diferem-se clinicamente e genotipicamente um do outro, de forma que, ao contrário dos HA-MRSA, a maioria das cepas de CA-MRSA são sensíveis a antimicrobianos não-beta-lactâmicos, e além disso, também tem sido demonstrado que as linhagens CA-MRSA e HA-MRSA não são relacionadas umas às outras (GROOM *et al.*, 2001). A grande diversidade clonal de CA-MRSA em comparação aos HA-MRSA, sugere que a maioria das linhagens *S. aureus* possui habilidade para adquirir o SCCmec (FRANCOIS *et al.*, 2008).

Estudos recentes vêm mostrando a dispersão de clones de CA-MRSA para o interior dos centros de saúde. Entre os anos 1994 e 2000, pesquisas realizadas nos EUA mostraram que a proporção de amostras de HA-MRSA carreando SCC*meclV* (típico de CA-MRSA) aumentou de 20 a 50% (KLEVENS *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram relatados em um hospital francês, sendo que no período de 1992 a 2002, o número de cepas de HA-MRSA carreando o SCC*meclV* aumentou significativamente (DONNIO *et al.*, 2004). Da mesma forma, um estudo na Itália, demonstrou a migração de cepas de MRSA possuindo o SCC*meclV* da comunidade para o ambiente hospitalar. Além disso, esse estudo observou que, apesar de mostrarem susceptibilidade em relação a muitos antimicrobianos, tinham adquirido alguns determinantes de resistência (CAMPANILE *et al.*, 2011). Diversos estudos têm detectado amostras clínicas de *S. aureus* originárias de clones epidêmicos típicos dos CA-MRSA (BASSET *et al.* 2015; TAYLOR *et al.*, 2015; TOKAJIAN, 2014).

O número de casos de infecção por CA-MRSA vêm aumentando rapidamente em todo o mundo. Nos EUA, no início de 2000, uma pesquisa feita em 11 hospitais norte-americanos mostrou que 97% das amostras de CA-MRSA correspondiam ao clone USA300 (ST8), apresentavam o SCC*meclV* e o gene da PVL. Além disso, eram sensíveis à rifampicina, trimetoprima/sulfametoxazol, clindamicina e tetraciclina (PALLIN *et al.*, 2008). Em comparação aos EUA, infecções por CA-MRSA não têm sido tão frequentes na Europa Ocidental, onde a cepa de CA-MRSA mais comum possui o ST80 (CC80), SCC*meclV* e o gene da PVL (SANCHIN *et al.*, 2011). No leste da Ásia, a linhagem de CA-MRSA mais dominante é a ST59 (SCC*mec IV*), todavia, ST30, ST239 (CC8) e ST5 também são detectadas (SONG *et al.*, 2011).

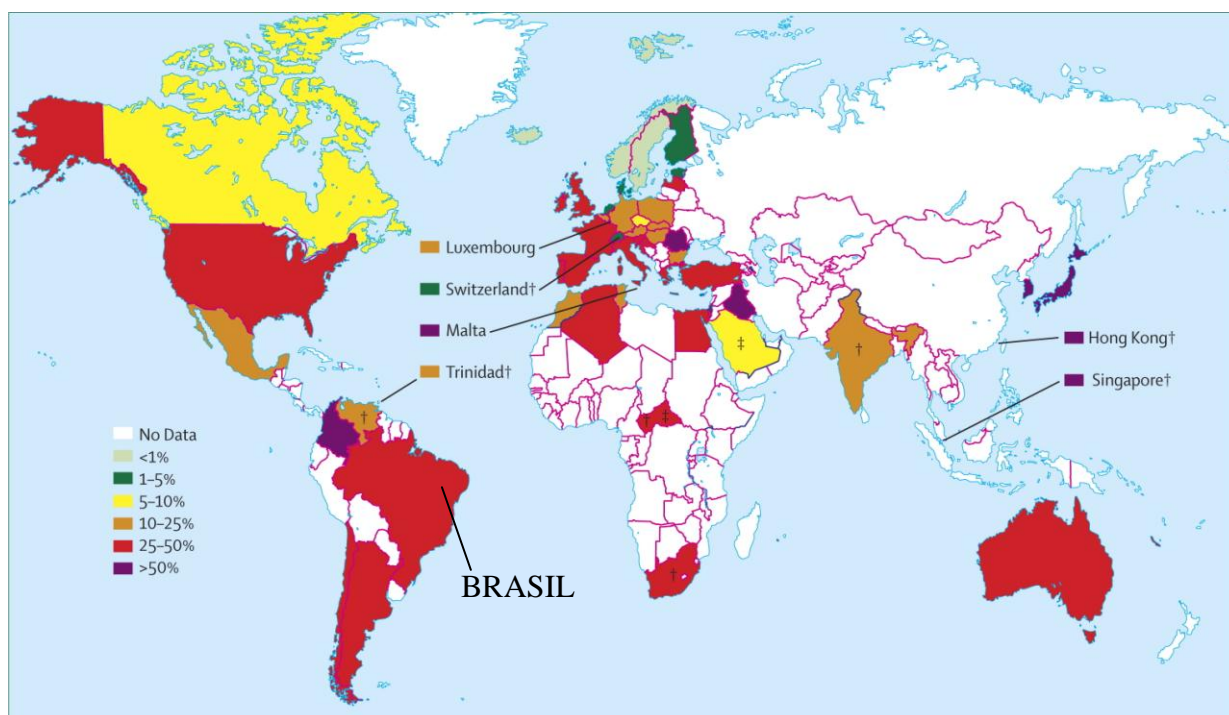
Os primeiros casos de CA-MRSA da América do Sul foram reportados no Brasil por RIBEIRO *et al.* (2005). Neste estudo foram isoladas três amostras de infecções de pele e tecidos moles (duas amostras) e artrite séptica (uma amostra). Todas as amostras albergavam o SCC*meclV* e foram relacionadas ao clone OSPC (do inglês: “*Oceania Southwest Pacific clone*”), sendo originários de dois hospitais de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. São conhecidos algumas cepas de CA-MRSA circulantes no país que estão associadas ao clone USA 1100. Amostras clínicas associadas ao clone USA300 também foram detectados em 2007 no Rio de Janeiro e em Porto Alegre (RIBEIRO *et al.*, 2007).

O primeiro caso grave de infecção causada por CA-MRSA no Brasil foi publicado em 2009. Tratava-se de um caso de osteomielite associada a uma amostra pertencente ao clone USA1100 (linhagem ST30) sensível a todos antimicrobianos não beta-lactâmicos testados (ROZENBAUM *et al.*, 2009). Além deste, outra infecção associada a CA-MRSA foi reportada por DE ARAÚJO *et al.* (2010) em um caso grave de piomiosite severa (infecção da musculatura esquelética) em uma criança previamente saudável em um hospital no Rio de Janeiro.

### 1.6 Epidemiologia das infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

O primeiro *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (NTCT 10442) foi isolado na Inglaterra em 1961, apresentando o SCC*mecl*, foi denominado clone Arcaico (ITO *et al.*, 2001). Durante os anos seguintes, cepas provenientes deste clone dispersaram-se para outros países da Europa. Durante a década de 1970, os MRSA disseminaram-se globalmente, isto é, para países como Austrália, Japão e EUA. Os MRSA são reconhecidos como os maiores causador de infecções nosocomiais em todo o mundo (GRUNDMANN *et al.*, 2006; STEFANI *et al.*, 2012).

Em todos os continentes é possível verificar uma alta prevalência de cepas de MRSA. Como demonstra a Figura 6, é possível verificar que as taxas de prevalência mais altas (>50%) são reportadas na Colômbia, Ásia, Oriente Médio e na Ilha de Malta, ao passo que, taxas intermediárias (25 a 50%) são verificadas no Brasil, EUA, China, Austrália, África e alguns países europeus, enquanto que no Canadá e em outros países da Europa apresentam baixa prevalência (GRUNDMANN *et al.*, 2010; SONG *et al.*, 2011; MEJÍA *et al.*, 2010.)



**Figura 6.** Prevalência mundial de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em casos de infecções hospitalares. Fonte: adaptado de GRUNDMANN *et al.*, 2006.

Amostras de MRSA provenientes do mesmo clone bacteriano são células geneticamente idênticas que descendem de um ancestral comum. Ao decorrer do tempo, estas cepas podem diferenciar-se geneticamente, através de mutações, recombinações, ou pela aquisição ou deleção de elementos genéticos móveis (EGMs). Essa diferenciação genética muitas vezes auxilia no desenvolvimento da virulência e resistência destas cepas, repercutindo na extensa variabilidade fenotípica e genômica verificada entre as estirpes de MRSA (RODRIGEZ-NORIEGA *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos e métodos de tipagem são requeridos para compreender a dispersão global de clones de MRSA, sendo assim, é necessário investigar a variação genética entre as cepas de *S. aureus*, a estrutura e a dinâmica populacional (STEFANI *et al.*, 2012).

A maioria amostras de HA-MRSA no mundo, são derivadas de uma das cinco linhagens mais importantes, os complexos clonais (CCs): 5, 8, 22, 30 e 45. Dados de vigilância epidemiológica identificaram cinco clones pandêmicos predominantes na maioria dos MRSA isolados de todo o mundo, são eles os clones: Brasileiro, Ibérico, Húngaro, Pediátrico, e Nova Iorque/Japão (NYJ – do inglês: “*New York/Japan*”) (DEURENBERG, 2008).

O clone Ibérico foi identificado inicialmente na Espanha em 1989, e nos anos seguintes passou a ser detectado em outros países europeus e nos EUA, enquanto que o clone Húngaro foi isolado de hospitais da Hungria e tem sido encontrado em países asiáticos. O clone NYJ tem sido identificado em hospitais de alguns estados dos EUA e também em Tóquio no Japão, ao passo que o clone Pediátrico foi localizado, inicialmente, em um hospital Pediátrico em Portugal (1992), e posteriormente, disseminado globalmente para países europeus, EUA e da América do Sul. O clone Brasileiro foi isolado e descrito em 1995 em diversos hospitais do Brasil e de outros países vizinhos, além disso, estudos posteriores reportaram a presença deste clone em outros países, evidenciando sua disseminação em nível global (DOMINGUEZ *et al.*, 1994; ROBERTS *et al.*, 1998; SANCHES *et al.*, 1998; CRISOSTOMO *et al.*, 2001; ROBERTS *et al.*, 2000; AIRES DE SOUZA *et al.*, 2000, SÁ-LEÃO *et al.*, 1999, TEIXEIRA, LOURENÇO & FIGUEIREDO, 1996; AIRES DE SOUZA *et al.*, 2001).

A técnica de análise de padrão de fragmentação do DNA bacteriano após tratamento com enzima de restrição e posterior eletroforese de campo pulsado (PFGE – do inglês: “*pulsed-field gel electrophoresis*”) têm contribuído no avanço dos estudos epidemiológicos, sobretudo em estudo envolvendo amostras isoladas de uma mesma localidade em curto período de tempo (TENOVER *et al.*, 1995). Implementada e padronizada desde 1995, a presente técnica possui como maior vantagem o seu alto poder de discriminação entre as amostras isoladas, e como desvantagens estão a portabilidade de dados limitada e a falta de padronização das nomenclaturas em nível global (STRUELENS *et al.*, 2009).

ENRIGHT e colaboradores (2000) desenvolveram a técnica de tipagem por seqüenciamento de multilocus enzimáticos (“multilocus sequence typing”, MLST) na caracterização de amostras de MSSA e MRSA. Através dessa técnica, sete genes constitutivos (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *tpi*, *yqiL* e *pta*) que codificam enzimas de manutenção celular são seqüenciados, após sua amplificação por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Cada nova sequência caracteriza-se por um novo alelo. A combinação desses sete alelos forma o perfil alélico (“sequence type”, ST) de cada amostra. Os resultados obtidos com o uso do MLST são utilizados para a construção de um banco de dados que permite a comparação de amostras de *S. aureus* isoladas de várias partes do mundo.

Muitas linhagens *S. aureus* são descritas a partir de tipagem por seqüenciamento multilocus (MLST) dos complexos clonais (CCs), conforme exibido na Tabela 1. Dentre os cinco principais complexos clonais existentes, o CC5 e o CC8 mostram-se os mais prevalentes no mundo. Contendo diversos STs, os CCs encontram-se amplamente distribuídos entre os continentes. CC22 é detectado em todo o mundo, CC30-ST36 é comum nos EUA e na Inglaterra, o CC45 é mais comum nos EUA e Europa, ao passo que nos países asiáticos são frequentemente encontrados o CC8 (ST 239), o CC5 (ST5) e o CC22 (ST22), enquanto que na América Latina e na África são comumente encontrados cepas relacionadas aos CC8 (ST 239), CC5 (ST5) e CC30 (KO *et al.*, 2005; DEURENBERG, 2008; RODRIGEZ-NORIEGA *et al.*, 2010; MOODLEY *et al.*, 2010; SONG *et al.*, 2011).



**Tabela 1.** Linhagens dos principais complexos clonais de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina e sua distribuição mundial\*.

Complexo Clonal (CC)	Linhagem (ST)	Clones Epidêmicos	Distribuição mundial
CC1	ST1-SCC <sub>medV</sub>	USA400 (CA-MRSA)/ USA400 Brasileiro (HA-MRSA)	Austrália, Canadá, Europa, América do Sul, EUA
CC5	ST5-HA-MRSA-II	Nova Iorque/Japão, USA100	EUA, Japão, Canadá, Coreia do Sul, Austrália, Europa
	ST5-HA-MRSA-IV	Pediátrico, USA800	EUA, América do Sul, Europa
	ST5-HA-MRSA-I	UK-EMRSA-3	Europa, América do Sul
	ST228-HA-MRSA-I	Italiano/ Sul Alemão	Europa
	ST5-MRSA-II/IV		África
	ST5-CA-MRSA-IV	USA800	EUA, América do Sul, Europa
CC8	ST8-HA-MRSA-IV	UK-EMRSA-2/6, USA500, USA300	Canadá, EUA, Europa, Austrália
	ST8-CA-MRSA-IV		Ásia, Europa, Austrália, EUA
	ST247-HA-MRSA-I	Ibérico ou UK-EMRSA-5, Romano	EUA, Europa
	ST239-HA-MRSA-III	Brasileiro, Húngaro,	Ásia, Austrália, África do Sul, América do Sul, Europa
	ST612-HA-MRSA-IV (variante do ST8)		África do Sul, Austrália
C22	ST22-HA-MRSA-IV	UK-EMRSA-15	Europa, Indonésia, Canadá
	ST36-HA-MRSA-IV	UK-EMRSA-16, USA200	Indonésia
CC30	ST36-HA-MRSA-II	UK-EMRSA-16, USA200	EUA, Inglaterra, Austrália, Canadá, África do Sul
	ST30-CA-MRSA-IV	USA1100, OSPC	América do Sul, EUA
CC45	ST45-HA-MRSA-IV	Berlin, USA600	EUA, Europa
CC59	ST59-CA-MRSA-IV/VII	USA1000	Ásia, Europa, Austrália, EUA
CC80	ST80-CA-MRSA-IV	Europeu	Ásia, Europa, Austrália

\* adaptado de STEFANI *et al.* (2012) e DEURENBERGH & STOBBERINGH (2008); CA-MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina adquirido na comunidade; HA-MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina associados aos cuidados de saúde.

## 2 JUSTIFICATIVA

*Staphylococcus aureus* é reconhecido, atualmente, como a espécie bacteriana mais frequente em casos de infecção associada aos cuidados de saúde (IRAS) no Brasil e no mundo.

Em função da diversidade de fatores de virulência codificados em seu genoma, este microrganismo possui uma capacidade particular de gerar diversas doenças. Além disso, este patógeno oportunista é capaz de resistir à ação de diversos antimicrobianos em decorrência da aquisição de diferentes genes de resistência.

Infecções causadas por *S. aureus* apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade, além de aumentar o tempo de internação e elevar custos de hospitalização, onerando tanto instituições públicas quanto privadas. Sendo assim, a dispersão deste microrganismo na comunidade e no interior dos ambientes hospitalares mostra-se uma situação extremamente relevante.

Em termos de saúde coletiva e do desenvolvimento de conhecimento científico e tecnológico, é imprescindível que a comunidade conheça o panorama atual das IRAS, bem como o perfil fenotípico e genotípico das amostras causadoras de infecções em sua região. É nesse contexto que o presente estudo vem no intuito de identificar a epidemiologia, perfil de resistência e virulência das amostras *S. aureus* associadas a infecções nos hospitais da Grande Vitória, Espírito Santo. Tendo em vista que ainda não existem dados detalhados envolvendo o perfil de resistência, o tipo de SCCmec e o perfil de virulência das amostras de *S. aureus* isoladas em nossa região, o presente estudo mostra-se pioneiro nessa área, além de auxiliar a contribuir para o controle de infecção nas instituições pesquisadas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Por meio da análise de aspectos relacionados à virulência, resistência a antimicrobianos e epidemiologia molecular, o presente estudo possui o objetivo geral de caracterizar 100 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus*, provenientes de cinco hospitais da Grande Vitória (Espírito Santo).

#### 3.2 Objetivos específicos e estratégias utilizadas

- Determinar o perfil de susceptibilidade das amostras a 13 antimicrobianos através do teste de difusão a partir do disco, segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2014;
- Avaliar a concentração mínima inibitória (CMI) para os antimicrobianos oxacilina e vancomicina através do teste de diluição em ágar, segundo o CLSI (2014);
- Realizar a determinação do tipo de cassete cromossômico *mec* estafilocócico (SCC*mec*) nas amostras de MRSA através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Determinar o perfil de virulência das amostras *S. aureus* investigando presença de genes de virulência associados à expressão de adesinas (*fnbB*, *fnbA*, *bbp*, *cna* e *ebpS*) e de toxinas (*lukS-F*, *tsst*, *sec*, *see* e *sea*), por meio da técnica de PCR;
- Caracterizar e distinguir genotipicamente as amostras de MRSA encontradas no presente estudo através da análise do padrão de fragmentação do DNA cromossômico das amostras com uso da enzima de restrição *Sma*I e separação por eletroforese de campo pulsado (PFGE).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Locais de isolamento das amostras

Todas as amostras de *S. aureus* foram provenientes de pacientes atendidos em cinco hospitais da Grande Vitória – Espírito Santo, a saber:

1) Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes (HUCAM) - incorporado à Universidade Federal do Espírito Santo, localiza-se no campus universitário do Centro de Ciências da Saúde em Maruípe (Vitória); também conhecido como Hospital das Clínicas, o HUCAM possui 314 leitos, sendo nove de terapia intensiva. Cerca de 16.000 consultas são realizadas mensalmente e 1.200 procedimentos cirúrgicos ocorrem no mesmo período em diversas especialidades médicas existentes.

2) Hospital Meridional - localizado no município de Cariacica, é especializado em tratamentos de alta complexidade como transplantes, terapia intensiva, neurologia e oncologia. Possui um total 165 leitos, sendo 62 destinados à terapia intensiva e divididos em cardiologia, neurologia, hepática, geral e infantil. O Hospital Meridional realiza cerca de 5.200 consultas ambulatoriais ao mês dentre as 65 especialidades médicas existentes.

3) Hospital Santa Rita de Cássia - referência no tratamento de câncer, destina mais de 60% do atendimento ao público do Sistema Único de Saúde (SUS). Localizado em Vitória, o Hospital Santa Rita conta com 10 leitos de terapia intensiva de um total de 270 leitos de internação. Por ano, o hospital realiza mais de 500 mil atendimentos em 43 especialidades médicas distintas.

4) Hospital Antônio Bezerra de Farias (HABF) - localizado no bairro Jaburuna em Vila Velha, faz parte da rede estadual pública cujo perfil de atendimento é voltado para urgência e emergência, destinando-se a pacientes de baixo e médio risco. Sendo referência em cirurgias de mão, o HABF atende diariamente em seu

ambulatório por volta de 35 pacientes e realiza em média oito cirurgias dentre as 12 especialidades existentes.

5) Clínica dos Acidentados de Vitória é um hospital privado especializado em atendimentos ortopédicos. A Clínica dos Acidentados destina-se a pacientes de média complexidade e internação. Realiza atendimentos desde imobilização até cirurgias ortopédicas e fisioterapia, possuindo seis leitos de terapia intensiva de um total 51 leitos, sendo 36 destinados ao SUS.

## **4.2 Amostras bacterianas**

### **4.2.1 Aspectos éticos e legais**

O presente estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e está registrado com o número 247/2011.

### **4.2.2 Identificação das amostras bacterianas**

Estão envolvidas neste estudo, 100 amostras de *S. aureus* obtidas entre abril de 2011 e fevereiro 2012 nos hospitais citados na seção anterior. Deste total de amostras, 70 foram isoladas do HUCAM, 16 do Hospital Meridional, 12 do Hospital Santa Rita de Cássia, duas do HABF e uma da Clínica dos Acidentados.

A identificação das amostras foi realizada pelos laboratórios de microbiologia dos próprios hospitais ou laboratórios particulares conveniados. Assim, a identificação das cepas de *S. aureus* deu-se por meio de sistemas automatizados utilizados por estes laboratórios, os quais são capazes de realizar a identificação e os testes de sensibilidade simultaneamente.

Após serem identificadas em seus respectivos laboratórios de origem, as amostras de *S. aureus* foram enviadas ao nosso laboratório, onde foram realizados os testes confirmatórios de identificação descritos a seguir.

Inicialmente, as amostras foram cultivadas em ágar-sangue (Plast Labor LTDA, Brasil) e incubadas a 35 °C, por até 48 horas, para análise da pureza, morfologia colonial e presença de hemólise. Posteriormente, foram realizados os seguintes testes:

#### **a) Produção da enzima catalase**

A partir de cultura bacteriana em ágar TSA ("Trypticase Soy Agar", Difco Laboratories, França) foram transferidas 3 colônias para uma lâmina de vidro que

continha uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v). A produção de bolhas foi indicativa de reação positiva. As amostras de *S. aureus* ATCC 12600 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

b) Susceptibilidade à bacitracina

Uma suspensão bacteriana com uma turbidez equivalente à 0,5 da escala McFarland ( $\sim 10^8$  UFC/mL) foi preparada em salina 0,9% (p/v) e semeada, confluentemente, com auxílio de um “swab” em agar Müller-Hinton (Difco Laboratories). Posteriormente, foi depositado sobre o meio, um disco impregnado de bacitracina 0,04U (Cecon, Brasil) e a placa foi incubada a 35 °C por 18h. Um halo menor ou igual a 10 mm foi indicativo de resistência à bacitracina. As amostras utilizadas como controles do teste foram *S. aureus* ATCC 12600 (resistente) e *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (sensível).

c) Cultivo em ágar manitol salgado:

A partir de cultura bacteriana em ágar TSA, foi realizada a semeadura por esgotamento no ágar manitol salgado (Oxoid) e as placas foram incubadas a 35 °C por 48h. Neste meio, os *Staphylococcus aureus* fermentam o manitol produzindo uma zona amarela. Como controle do teste foram utilizados *S. aureus* ATCC 12600 como controle positivo e *S. epidermidis* ATCC 12228 como controle negativo.

d) Produção da enzima coagulase

A partir do crescimento bacteriano em meio ágar-sangue três colônias foram transferidas para um tubo contendo plasma de coelho diluído a 1:2 (v/v) em solução salina 0,9% (p/v). Foi realizada incubação a 37 °C, por 4h, em banho de imersão. Em seguida, foi verificada a produção ou não de coágulo. Nos testes que ainda se apresentavam negativos, uma nova leitura foi realizada após 24h de incubação. Amostras de *S. aureus* ATCC 12600 e *S. epidermidis* ATCC 14990 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

### 4.3 Testes de susceptibilidade e sensibilidade a antimicrobianos

#### a) Teste de difusão a partir do disco (*Clinical and Laboratory Standards Institute* [CLSI] 2014):

A fim de determinar o perfil de susceptibilidade das 100 amostras *S. aureus*, foram testados 13 antimicrobianos distintos (Cecon, Brasil): eritromicina (15µg), clindamicina (2 µg), cefoxitina (30 µg), penicilina (10UI), trimetoprima/sulfametoxazol (23,75 µg), linezolida (30 µg), tetraciclina (30 µg), rifampicina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), norfloxacina (10 µg) e mupirocina (5 µg).

O procedimento iniciou-se com a semeadura das amostras em ágar nutriente e incubação a 35 °C durante 18-24 h. Posteriormente, as colônias foram diluídas em solução salina 0,9% (p/v) até atingir um padrão de turvação de 0,5 da escala McFarland, correspondendo a, aproximadamente,  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Esta solução, por sua vez, foi semeada em ágar Müller-Hinton (Difco Laboratories), com o auxílio de um *swab* a fim de se obter um crescimento homogêneo em toda superfície do ágar. Em seguida, os discos de antimicrobianos foram colocados sobre o meio de cultura. Após 18-24 horas de incubação a 35 °C foi realizada a leitura do teste. Todo procedimento, bem como a leitura dos halos de inibição deu-se conforme os parâmetros estabelecidos pelo CLSI (2013), tendo como controle a amostra padrão *S. aureus* ATCC 25923. A leitura do teste de difusão a partir do disco de mupirocina deu-se conforme o estabelecido por FINLAY *et al.* (1997).

#### b) Teste de determinação da concentração mínima inibitória (CMI):

A determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMIs) de oxacilina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e vancomicina (Sigma-Aldrich) foi realizada pelo método de diluição em ágar, segundo o CLSI (2013). As amostras bacterianas foram, inicialmente, semeadas em agar-sangue, por 18-24h, a 35 °C. O crescimento



microbiano foi então diluído em salina 0,9% (p/v) para obtenção do padrão de turvação 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida, foi realizada uma diluição 1:10 (v/v) em salina 0,9% e as amostras foram transferidas para o replicador de “Steers”. Posteriormente, as amostras ( $\sim 10^4$  UFCs/mL) foram inoculadas nas placas contendo agar Mueller-Hinton (Difco Laboratories) em concentrações crescentes do antimicrobiano, variando de 0,25 a 256  $\mu\text{g/mL}$ . Posteriormente, as placas foram incubadas por 24h à 35 °C. A leitura do teste foi realizada de acordo com os valores do CLSI (2014). Foi utilizada a amostra *S. aureus* ATCC 29213 como controle do teste.

#### 4.4 Liberação do DNA bacteriano

Foram utilizadas duas técnicas para obtenção do DNA das amostras clínicas de *S. aureus*: a liberação do DNA por lise térmica e por lise enzimática.

A obtenção do DNA por lise térmica deu-se de acordo com NUNES *et al.* (1999) com adaptações, iniciando com a semeadura das amostras clínicas de *S. aureus* em meio ágar nutriente e incubadas a 37 °C. Após 24 horas, cerca de três a cinco colônias de cada amostra foram transferidas para microtubos contendo 200 µL de água estéril seguido pela homogeneização da suspensão por agitação. Com o objetivo de romper a membrana celular bacteriana, os microtubos contendo a suspensão foram mantidos a 100 °C por 10 minutos, e após retornarem à temperatura ambiente (25 °C) foram homogeneizados por agitação novamente. Seguidamente, as amostras passaram por centrifugação a 12.000 g por 1 minuto, e 80 µL de cada sobrenadante contendo DNA foram coletados, transferidos para novos microtubos e armazenados a -20° C.

A liberação do DNA bacteriano por lise de enzimática foi realizada de acordo com PITCHER, SAUDERS & OWEN (1989) com adaptações. Inicialmente, as amostras foram semeadas em meio ágar nutriente e incubadas por 24 horas a 36 °C. Após crescidos, as colônias bacterianas foram suspensos em solução salina 0,9% (p/v) até atingir um padrão de turvação de 2,0 da escala McFarland, correspondendo a aproximadamente  $6 \times 10^8$  UFC/mL. Posteriormente, 1,5 mL desta suspensão foi centrifugada a 10.000 g por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante ao final. As células foram suspensas em 1,5 mL de TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), homogeneizadas por agitação e centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante após a centrifugação. As células bacterianas foram novamente suspensas em 100 µL de solução de lise (TE 1X, Lisozima 50.000 U e BRIJ 0.5% - (Sigma-Aldrich). Em seguida adicionou-se 3,0 µL da enzima lisostafina com concentração de 50 U (Sigma-Aldrich). Os microtubos foram homogeneizados por agitação e incubados por 1h a 37 °C, sendo homogeneizados manualmente a cada 15 minutos. Ao término da incubação, os microtubos permaneceram em temperatura ambiente por sete minutos e foram resfriados em gelo por 10 minutos.

Posteriormente, adicionou-se 250  $\mu$ L de acetato de amônio 7,5 M (Dinâmica, Brasil) e manteve-se no gelo por mais 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 500  $\mu$ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (Dinâmica). Após serem homogeneizados, os microtubos foram centrifugados a 12.000 g por 12 minutos onde foi possível verificar a formação de duas fases. Aproximadamente 700  $\mu$ L da fase aquosa (superior) foi transferida para um novo microtubo e então foi adicionado 430  $\mu$ L de isopropanol gelado. O microtubo foi então invertido gentilmente algumas vezes até ser observado um precipitado fibroso branco, logo após, foi centrifugado durante 5 minutos a 12.000 g. Depois da centrifugação, descartou-se o sobrenadante e foi realizada a lavagem por 5 vezes com 100  $\mu$ L de etanol 70% (Dinâmica). Após descartar o sobrenadante da última lavagem, os microtubos foram centrifugados novamente (12.000 g por 1 min.) para retirar todo restante do etanol com o auxílio de uma pipeta. O precipitado foi dissolvido em 80  $\mu$ L de TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) e incubados por 16 horas a 55 °C. Após a incubação, os microtubos foram armazenados a -20 °C.

#### 4.5 Tipagem do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

A determinação do tipo do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) das amostras *S. aureus* resistentes à meticilina foi realizada de acordo com a metodologia de Milheirico, Oliveira & Lancastre (2007).

A presente técnica consiste na amplificação simultânea de múltiplos amplicons por meio de uma reação em cadeia da polimerase multiplex, na qual foram adicionados 10 pares de primers ao volume de reação. Os 20 oligonucleotídeos específicos utilizados, suas sequências nucleotídicas e o tamanho dos fragmentos amplificados estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Sequência nucleotídica, tamanho do amplicon e especificidade dos primers utilizados na reação de PCR-multiplex para tipagem do cassete cromossômico *mec* das amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

Nome do primer	Oligonucleotídeo (5'-3')	Amplicon (pb)	Tipo de SCC <i>mec</i>
CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495	I
ccrC F2 ccrC R2	GTACTCGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	449	V
RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG ATGGAGATGAATTACAAGGG	414	II
SCC <i>mec</i> V - VJI F SCC <i>mec</i> V - VJI R	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC AGAGACTACTGACTTAAGTGG	377	V
dcs F2 dcs R1	CATCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342	I, II, IV, e VI
ccrB2 F2 ccrB2 R2	AGTTTCTCAGAATTCTGAACG CCGATATAGAAWGGGTAGC	311	II e IV
kdp F1 kdp R1	AATCATTCGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	284	II
SCC <i>mec</i> III - J1 F SCC <i>mec</i> III - J1 R	CATTTGTGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	243	III
<i>mecI</i> P2 <i>mecI</i> P3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCACTTGTC	209	II e III
<i>mecA</i> P4 <i>mecA</i> P7	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	162	controle positivo

Dessa forma, a partir do conjunto de oligonucleotídeos específicos amplificados, é possível determinar o tipo do SCC*mec* de cada amostra clínica de MRSA. Como controles internos da reação foram utilizados os primers *mecA* P4 e *mecA* P7, responsáveis pela amplificação do gene de resistência *mecA* (MILHEIRICO *et al.*, 2007).

O volume de reação de 50 µL foi constituído por: 1 µL de DNA extraído por lise enzimática; 5 µL do tampão da enzima (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos); 2,0 U de Taq DNA polimerase (Biotools, Espanha); 20 pmoles dos oligonucleotídeos: CIF2 R2 e F2, RIF2 F10 e F13, SCC*mec* VJI F e R, SCC*mec* V - VJI F e VJ1 R, SCC*mec* III- J1 F e J1 R; 40 pmoles dos oligonucleotídeos ccrC F2 e ccr R2, dcs F2 e R2, ccrB2 F2 e R2, *mecI* P2 e P3, *mecA* P4 e P7; e 10 pmoles dos oligonucleotídeos KD F1 e R1 (Invitrogen).

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (Veriti – Applied Biosystems, Life Technologies, Estados Unidos) obedecendo as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, acompanhada por 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94 °C mais 30 segundos de anelamento a 53 °C e também um minuto de extensão a 72 °C, sendo finalizado com 4 minutos de extensão a 72 °C.

Após a amplificação, o produto da PCR foi analisado em eletroforese de gel de agarose a 2,5% em tampão TBE 0,5X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). Depois de duas horas de corrida eletroforética a 100 V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur, Holanda) e sua imagem foi capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro, UNISCIENCE, Brasil). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado o 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen).

#### 4.6 Detecção de genes de virulência associados à expressão de adesinas

Com a finalidade de investigar a presença de genes de virulência associados à expressão de adesinas foram realizadas PCRs utilizando oligonucleotídeos correspondentes a cinco genes de adesinas, conforme representado na Tabela 3.

A detecção dos genes *bbp*, *cna* e *ebpS* foi realizada em PCR multiplex, enquanto que a detecção dos genes *fnbB* e *fnbA* ocorreu por PCR simples. Os métodos de detecção dos genes *bbp*, *cna*, *ebpS* e *fnbB* deu-se segundo TRISTAN *et al.* (2003), enquanto que a detecção do *fnbA* realizou-se de acordo com PEACOCK *et al.* (2002).

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos, genes de virulência investigados associados à expressão de adesinas e seus respectivos tamanhos de fragmentos gerados.

Gene de virulência	Oligonucleotídeo (5'-3')	Amplincon (pb)	Proteína codificada
<i>cna</i>	CNA1 - GTCAAGCAGTTATTACACCAGAC CNA2 - AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACT	423	proteína ligadora de colágeno
<i>bbp</i>	BBP1 – AACTACATCTAGTACTCAACAACAG BBP2 – ATGGTCTTGAATAACACCATCATCT	575	proteína de ligação à sialoproteína óssea
<i>ebpS</i>	EBP1 – CATCCAGAACCAATCGAAGAC EBP2 - CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTT	186	proteína ligadora de elastina
<i>fnbA</i>	FNBAF – CACAACCAGCAAATATAG FNBAR – CTGTGTGGTAATCAATGTC	1362	fibronectina A
<i>fnbB</i>	FNBB1 - GTAACAGCTAATGGTCTGAATTGATACT FNBB2 - CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	524	fibronectina B

Para todos os genes o volume de reação foi semelhante, onde em 25 µL estavam contidos: 1,0 µL de DNA extraído por lise enzimática ou 3 µL de DNA obtido por lise térmica; 2,5 µL de Tampão da enzima Taq (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen); 1,5 U de Taq DNA polimerase (Biotools, Espanha); 20 pmoles dos seus respectivos oligonucleotídeos.

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (Veriti – Applied Biosystems) sendo as seguintes etapas para os genes *bbp*, *cna*, *ebpS* e *fnbB*:

desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, acompanhada por 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C mais 1 minuto de anelamento a 55 °C e também um minuto de extensão a 72 °C, sendo finalizado com 10 minutos de extensão a 72 °C. As etapas de amplificação para o gene *fnbA* foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos acompanhada por 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C mais 1 minuto de anelamento a 50 °C e também dois minutos de extensão a 72 °C, sendo finalizado com 5 minutos de extensão a 72 °C.

Foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmar a amplificação dos fragmentos. A eletroforese deu-se em tampão TBE 0,5X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). Depois de uma hora e vinte minutos de corrida eletroforética a 100 V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur) e sua imagem foi capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro, Uniscience). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen) para os genes *bbp*, *cna*, *ebpS*, *fnbB* e *lukS-F*, enquanto que para o gene *fnbA* utilizou-se o marcador 1000 pb DNA *ladder* (Invitrogen).

#### 4.7 Detecção de genes de virulência associados à expressão de toxinas

Foi utilizada a técnica de PCR a fim de investigar a presença de cinco genes de virulência de toxinas, descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Oligonucleotídeos, genes de virulência investigados associados à expressão de toxinas e seus respectivos tamanhos de fragmentos gerados.

Gene de virulência	Oligonucleotídeo (5'-3')	Amplincon (pb)	Proteína codificada
<i>Tsst</i>	TSST1 – GCTTGCGACAATCGCTACAG	559	Toxina da síndrome do choque tóxico
	TSST2 – TGGATCCGTCATTCATTGTTAT		
<i>Sea</i>	SEA1 – TTGGAAACGGTTAAAACGAA	120	Enterotoxina A
	SEA2 – GAACCTTCCCATCAAAAACA		
<i>Sec</i>	SEC1 – CTTGTATGTATGGAGGAATAACAA	284	Enterotoxina C
	SEC2 – TGCAGGCATCATATCATACCA		
<i>See</i>	SEE1 – TACCAATTAACCTTGTGGATAGAC	171	Enterotoxina E
	SEE2 – CTCTTTGCACCTTACCGC		
<i>lukS-F</i>	PVL1 - ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433	Leucocidina de Pantón-Valentine
	PVL2 – GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC		

O gene *lukS-F* foi investigado conforme LINA *et al.* (1999), enquanto que os genes *tsst*, *sec* e *see* foram detectados de acordo com MONDAY *et al.* (1999), e o gene *sea* seguiu o estabelecido por JOHNSON *et al.* (1991).

A detecção de todos os cinco genes deu-se por reações de PCR simples, cujo volume de reação de 25 µL continha: 1 µL de DNA extraído por lise enzimática ou 3µL de DNA obtido por lise térmica; 2,5 µL de Tampão da enzima Taq (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen); 1,5 U de Taq DNA polimerase (Biotools); 20 pmoles dos seus respectivos oligonucleotídeos.

O ciclo de amplificação dos genes *tsst*, *sec* e *see* obedeceu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, acompanhada por 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95 °C mais 1 minuto de anelamento a 60 °C e também um minuto de extensão a 72 °C, sendo finalizado com 10 minutos de extensão a 72 °C. Enquanto que as etapas de amplificação para o gene *sea* foi: desnaturação inicial a



94 °C por 2 minutos acompanhada por 30 ciclos de 2 minutos de desnaturação a 94 °C mais 1 minuto de anelamento a 55 °C e também 1 minuto de extensão a 72 °C, sendo finalizado com 5 minutos de extensão a 72 °C. O ciclo de amplificação do gene *lukS-F* foi: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, acompanhada por 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C mais 1 minuto de anelamento a 55° C e também um minuto de extensão a 72 °C, sendo finalizado com 10 minutos de extensão a 72 °C.

Foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmar a amplificação dos fragmentos na PCR. A eletroforese deu-se em tampão TBE 0,5X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). Depois de uma hora e vinte minutos de corrida eletroforética a 100 V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur) e sua imagem foi capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro, UNISCIENCE). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen).

#### **4.8 Análise do padrão de fragmentação do DNA cromossômico das amostras com uso da enzima de restrição *Sma*I e separação em gel por eletroferese de campo pulsado PFGE.**

A técnica utilizada seguiu o protocolo estabelecido por VIVONI *et al.* (2005) com modificações. Inicialmente, as amostras de *S. aureus* foram semeadas em ágar nutriente e incubados a 37 °C por 24 - 48 horas. Após o crescimento, as colônias *S. aureus* foram suspensas em solução salina 0,9% (p/v) até atingir um padrão de turvação de 3,0 da escala McFarland, correspondendo a, aproximadamente,  $9 \times 10^8$  UFC/mL, e em seguida 1,5 mL da suspensão foi centrifugada em microtubo por 5 minutos a 4.000 g. Desprezado o sobrenadante, as células bacterianas foram suspensas em 250 µL de solução PIV (NaCl 1M, TRIS-HCl 10 mM, pH 7,6). Nesta suspensão adicionou-se o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (“*low melting point agarose*”, PROMEGA, EUA) a 2% dissolvida em solução PIV. Mantida a 58 °C, a solução contendo agarose foi distribuída em moldes cilíndricos e mantida em 4 °C por 10 minutos para enrijecimento. Posteriormente, a agarose foi cortada em discos nomeados “plugs”, e estes, por sua vez, foram incubados a 37° C em uma solução contendo solução de lise EC (Tris-HCl 6mM, NaCl 1M, EDTA 100 mM, 0,5 Brij 58 e 0,5% lauril sarcosinato de sódio, pH final 7,5) 50.000 U de lisozima (Sigma-Aldrich) e 50 U de lisostafina (Sigma-Aldrich). Após 18 horas, a solução anterior foi substituída por 2 mL de solução ESP (EDTA 0,4M pH 9,5, 1% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio) contendo 0,1mg/mL de proteinase K (Sigma-Aldrich), incubando-se novamente a 50° C por 18 horas. Ao final, a solução anterior foi removida e substituída por 2 mL de solução ESP e estocados a 4° C. A digestão do DNA cromossômico iniciou-se com a lavagem dos “plugs” cinco vezes seguidas de incubação a 37°C com o tampão TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), sendo que a cada hora o tampão era trocado, e na última lavagem os “plugs” permaneceram incubados por 18 horas. Seguidamente, o tampão foi removido e adicionou-se aos “plugs” uma solução contendo 250 µL do tampão da enzima *Sma*I (Thermo Scientific, EUA) e foi incubado a 25° C durante 4 horas. Após este período, a solução foi removida e adicionou-se um novo tampão da enzima contendo 20 U da enzima de restrição *Sma*I, incubando a 25° C por 18 horas. Finalmente, foi removida o tampão contendo a enzima *Sma*I, e os “plugs” foram fundidos a 70° C e aplicados

em poços de gel de agarose a 1% (Hygradene, EUA) submerso em tampão TBE 0,5X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2) a 14° C. A eletroforese deu-se equipamento de eletroforese de campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad), utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 35 segundos, durante 21 horas, a 6 V/cm, em angulação de 120°. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur) por 30 minutos e descorado por 20 minutos com água destilada, posteriormente, sua imagem foi capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro, Uniscience). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado o marcador 50-1.000 kb *Lambda Ladder PFGE Marker* (New England Biolabs).

O padrão de fragmentação das amostras clínicas foi verificado visualmente e foram classificados de acordo com os critérios de VAN BELKUM *et al.* (2007).

#### **4.9 Análises estatísticas**

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e a presença dos genes de virulência avaliados entre as amostras foram submetidos à análise estatística com o uso do teste Qui-quadrado. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Amostras bacterianas e fontes de isolamento

As 100 amostras *Staphylococcus aureus* envolvidas neste estudo foram provenientes das seguintes fontes: lesões cutâneas e secreções diversas (45 amostras), infecções de corrente sanguínea (41), ponta de cateter (11) e infecção urinária (3) (Tabela 5).

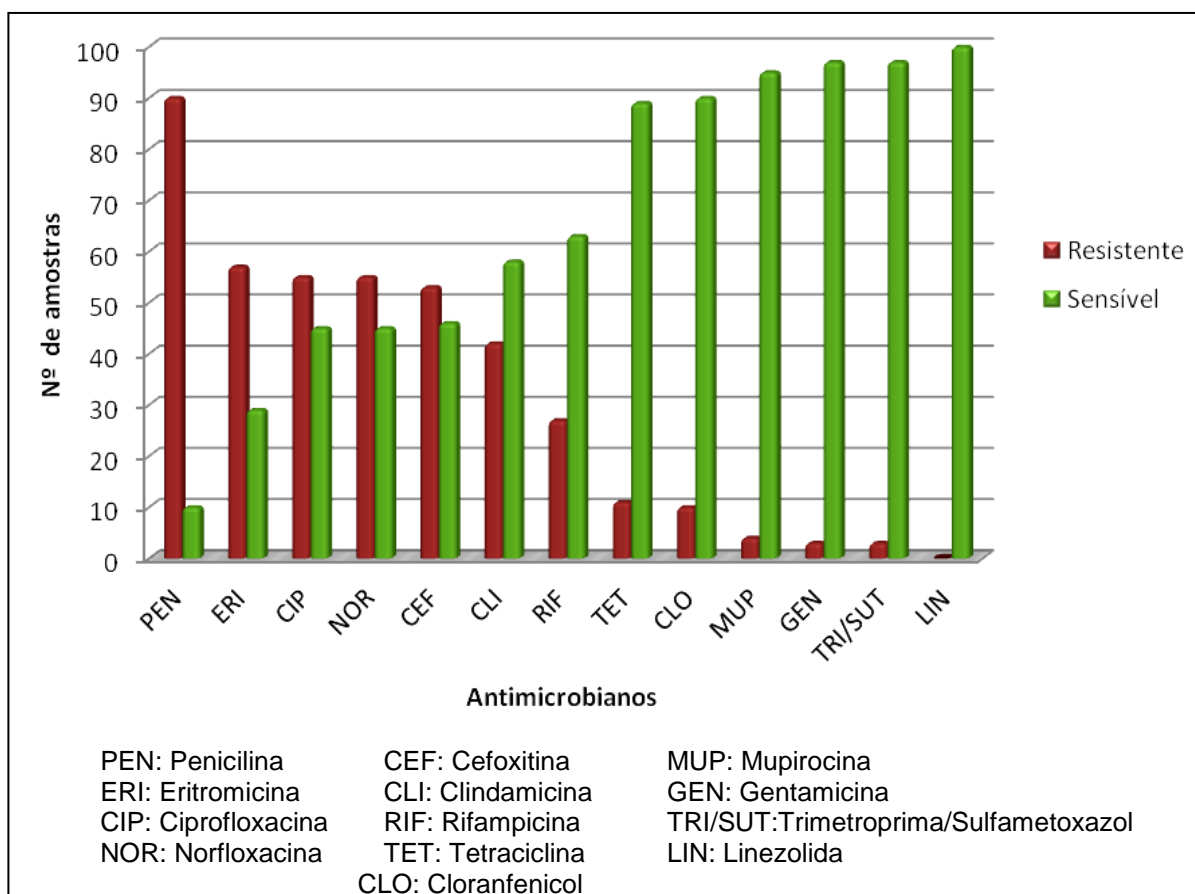
**Tabela 5.** Instituições de saúde e fontes de isolamento das amostras de *Staphylococcus aureus* analisadas no presente estudo.

Instituição de saúde*	Nº de amostras	Nº de amostras por fonte de isolamento			
		LCS*	sangue	cateter	urina
HUCAM	70	26	32	09	03
Hospital Santa Rita	14	09	04	01	-
Hospital Meridional	13	09	03	01	-
HABF	02	-	02	-	-
Clínica dos Acidentados	01	01	-	-	-
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>45</b>	<b>41</b>	<b>11</b>	<b>03</b>

\*HUCAM: Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes; HABF: Hospital Antônio Bezerra de Farias; LCS: lesões cutâneas e secreções de infecções diversas.

## 5.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

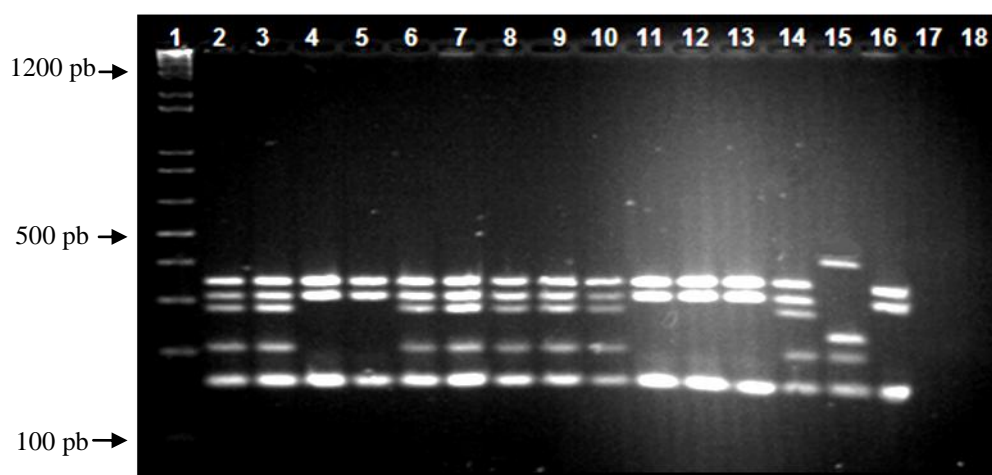
Os perfis de susceptibilidade aos 13 antimicrobianos testados estão apresentados no Gráfico 3. O antimicrobiano com maior taxa de resistência foi a penicilina (90 amostras), seguida pela eritromicina (57), ciprofloxacina (55), norfloxacina (55) e cefoxitina (53). A maior parte das cepas mostraram-se sensíveis à gentamicina (97 amostras), trimetoprima/sulfametoxazol (97), mupirocina (96), cloranfenicol (90), tetraciclina (89), rifampicina (73) e clindamicina (42). Todas as amostras foram sensíveis à linezolida.



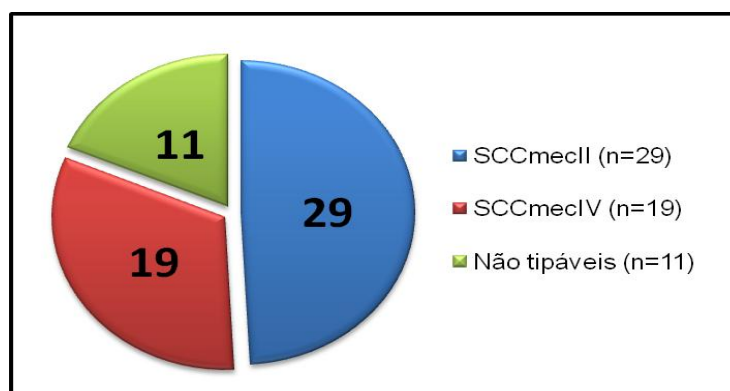
**Gráfico 3.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 100 amostras *Staphylococcus aureus* analisadas.

### 5.3 Tipagem do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

Após os testes de difusão a partir do disco, foi realizado o teste para detecção do gene *mecA* nas 100 amostras de *S. aureus*. Destas, 59 apresentaram esse gene, sendo portanto, consideradas MRSA. Todas estas amostras foram submetidas ao teste de tipagem do SCC*mec* (Figura 7). A determinação do tipo de SCC*mec* demonstrou que a maioria dos MRSA albergavam o SCC*mec*II, totalizando 29 amostras. Além dessas, 19 amostras apresentaram o SCC*mec*IV e em outras 11 não foi possível determinar o tipo de SCC*mec*, seja pela presença de bandas inespecíficas ou mesmo pela ausência de banda além da correspondente ao gene *mecA*. Assim, estas amostras foram consideradas “não tipáveis” Gráfico 4.



**Figura 7.** Foto ilustrativa da eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados para caracterização dos tipos de SCC*mec*. Linha1: marcador de tamanho molecular 100 pb; linhas 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10: amostras que apresentaram o SCC*mec*II; linhas 4, 5, 11, 12 e 13: amostras que apresentaram o SCC*mec*IV, linha 14: controle positivo apresentando SCC*mec*II (amostra Mu50); linha 15: controle positivo apresentando SCC*mec*III (amostra 1117); linha 16: controle positivo apresentando SCC*mec* IV (amostra 1125), linha 17: controle negativo sensível à meticilina (amostra 1128) e linha 18: branco.



**Gráfico 4.** Tipos dos cassetes cromossômicos estafilocócicos *mec* (SCC*mec*) detectados nas 59 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

#### 5.4 Comparação da susceptibilidade aos antimicrobianos não beta-lactâmicos entre as amostras de MRSA e MSSA.

Avaliando o perfil de susceptibilidade das amostras com diferentes tipos de *SCCmec* (Tabela 6) foi possível observar que o padrão de resistência das amostras com *SCCmecII* e não tipáveis se assemelham em relação à maioria dos antimicrobianos testados e que essas amostras se mostraram resistentes a um maior número de antimicrobianos que as amostras com *SCCmecIV*. Todas as 59 amostras de MRSA mostraram resistência superior a 60% para eritromicina, ciprofloxacina, norfloxacina, enquanto que apenas as amostras de MRSA com *SCCmecII* e não tipáveis apresentaram resistência superior a 50% para clindamicina e rifampicina. Em contraste, apenas duas (10%) amostras com *SCCmecIV* apresentaram resistência à clindamicina e nenhuma foi resistente à rifampicina. Das 59 amostras, apenas uma (que albergava o *SCCmecIV*) apresentou resistência à tetraciclina e, da mesma forma, apenas uma amostra, com o *SCCmecII*, foi resistente à trimetoprima/sulfametoxazol.

Dentre as 29 amostras com *SCCmecII*, cinco (17%) foram resistentes ao cloranfenicol, apenas duas (7%) foram resistentes à mupirocina e nenhuma amostra mostrou-se resistente à gentamicina. Das 19 amostras albergando o *SCCmecIV*, apenas uma apresentou resistência aos antimicrobianos cloranfenicol, mupirocina e gentamicina. Dentre as 11 cepas de MRSA não tipáveis, três (27%) foram resistentes ao cloranfenicol, um (9%) foi resistente à gentamicina e nenhuma apresentou resistência ao trimetoprima/sulfametoxazol e mupirocina (Tabela 6).

Ao comparar o padrão de resistência dos MRSA em relação aos MSSA, pode ser observado que as amostras de MSSA, em geral, mostraram-se mais sensíveis que os MRSA para quase todos os antimicrobianos não beta-lactâmicos testados, exceto tetraciclina e trimetoprima/sulfametoxazol. Dentre as 41 amostras de MSSA, 10 (24%) foram resistentes à tetraciclina e duas (5%) à trimetoprima/sulfametoxazol, como pode ser observado na Tabela 6. Para todos os demais antimicrobianos foi verificada uma menor taxa de resistência dos MSSA em relação aos MRSA.



**Tabela 6.** Perfil de resistência aos antimicrobianos não beta-lactâmicos em relação aos tipos de SCCmec das amostras *Staphylococcus aureus* do presente estudo.

Antimicrobiano*	Nº (%) de amostras resistentes			
	SCCmecII (n=29)	SCCmec IV (n=19)	Não tipáveis (n=11)	MSSA* (n=41)
ERI	29 (100)	12 (63,2)	09 (81,8)	08 (19,5)
CIP	29 (100)	13 (68,4)	10 (90,9)	03 (7,3)
NOR	29 (100)	13 (68,4)	10 (90,9)	03 (7,3)
CLI	29 (100)	02 (10,5)	08 (72,7)	03 (7,3)
RIF	21 (72,0)	0	06 (54,5)	0
CLO	05 (17,2)	01 (5,2)	03 (27,2)	01 (2,4)
MUP	02 (6,9)	01 (5,2)	0	01 (2,4)
GEN	0	01 (5,2)	01 (9,1)	01 (2,4)
TRI/SUT	01 (3,4)	0	0	02 (4,8)
TET	0	01 (5,2)	0	10 (24,4)
LIN	0	0	0	0

\* ERI: Eritromicina; RIF: Rifampicina; GEN: Gentamicina ; CIP: Ciprofloxacina; TET: Tetraciclina; TRI/SUT: Trimetoprima/Sulfametoxazol; NOR: Norfloxacina, CLO: Cloranfenicol; CLI: Clindamicina; MUP: Mupirocina; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina.

Após validação, em termos de significância estatística, do nível de resistência entre as amostras de MRSA e MSSA (Tabela 7), foi observado que os MRSA apresentaram maior taxa de resistência à eritromicina, ciprofloxacina, clindamicina e rifampicina, quando comparados aos MSSA deste estudo. Por outro lado, foi verificado que os MSSA foram mais resistentes à tetraciclina que o grupo dos MRSA. Além disso, não houve diferença significativa entre as taxas de resistência à mupirocina, cloranfenicol, gentamicina e trimetoprima/sulfametoxazol entre os grupos de MRSA e MSSA.

**Tabela 7.** Significância estatística da resistência aos antimicrobianos não-beta-lactâmicos comparando os grupos de *Staphylococcus aureus* resistentes ou sensíveis à metililina.

Antimicrobiano	Teste qui-quadrado (X <sup>2</sup> )	valor-p	Correção de Yates	Prevalência significativa (MRSA x MSSA)
ERI	42,257	< 0,0001	não	MRSA
CIP	60,615	< 0,0001	não	MRSA
NOR	60,615	< 0,0001	não	MRSA
CLI	34,315	< 0,0001	não	MRSA
RIF	25,702	< 0,0001	não	MRSA
CLO	3,105	0,0780	sim	insignificante
MUP	0,021	0,8845	sim	insignificante
GEN	0,104	0,7476	sim	insignificante
TRI/SUT	0,104	0,7476	sim	insignificante
TET	10,514	0,0012	sim	MSSA
LIN	-	-	-	-

\* nível de significância  $\alpha = 0,05$ ; ERI: Eritromicina; RIF: Rifampicina; GEN: Gentamicina ; CIP: Ciprofloxacina; TET: Tetraciclina; TRI/SUF: Trimetroprima/Sulfametoxazol; NOR: Norfloxacina, CLO: Cloranfenicol; CLI: Clindamicina; MUP: Mupirocina; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à metililina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensíveis à metililina.

### 5.5 Determinação da concentração mínima inibitória de oxacilina e vancomicina

De acordo com os testes de sensibilidade à oxacilina e vancomicina feitos por diluição em ágar, 48 das 100 amostras de *S. aureus* mostraram-se sensíveis à oxacilina, apresentando valor de concentração mínima inibitória (CMI) inferior ou igual a 2,0µg/mL para este antimicrobiano. As outras 52 amostras foram resistentes a este fármaco, apresentando CMIs  $\geq 4,0\mu\text{g/mL}$ . Além disso, todas as 100 amostras apresentaram valores de CMIs  $\leq 2,0\mu\text{g/mL}$  para vancomicina, sendo classificadas como sensíveis a este antimicrobiano, conforme pode ser verificado na Tabela 8.

As amostras de MRSA com SCCmecII apresentaram CMIs de oxacilina mais elevadas, com valores  $\geq 64\mu\text{g/mL}$ , ao passo que amostras com SCCmecIV apresentaram valores de CMIs mais baixos e próximos ao ponto de corte, entre 4 e 32 µg/mL (Tabela 8).

**Tabela 8.** Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMIs) de oxacilina e vancomicina das 100 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus*.

Amostras*	CMI oxacilina (µg/mL)										CMI vancomicina (µg/mL)					
	$\leq 0,5$	1	2	4	8	16	32	64	128	$\geq 256$	$\leq 0,5$	1	2	4	8	16
MRSA																
SCCmecII (n=29)	-	-	-	-	-	1	-	4	17	7	-	26	2	-	-	-
SCCmecIV (n=19)	-	1	5	1	3	-	1	6	1	1	3	15	1	-	-	-
Não tipáveis (n=11)	-	1	-	-	-	-	-	4	4	2	1	7	4	-	-	-
MSSA (n=41)	37	3	1	-	-	-	-	-	-	-	1	39	1	-	-	-
<b>Total (n=100)</b>	<b>37</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>14</b>	<b>22</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>87</b>	<b>8</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

\*MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina.

Pelo teste de diluição em ágar, sete amostras que apresentaram o gene *mecA* (seis com SCCmecIV e uma não tipada) mostraram-se sensíveis à oxacilina, apresentando valor de CMI  $\leq 2,0\mu\text{g/mL}$ . Dessa forma, o presente teste foi repetido três vezes nestas amostras a fim de ratificar este resultado. Adicionalmente, também foi repetido o teste de difusão a partir do disco de cefoxitina (antimicrobiano padrão para detecção de resistência à beta-lactâmicos) e foi confirmado que estas amostras apresentavam o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano próximo ao

ponto de corte, conforme representado na Tabela 9. Segundo o CLSI (2014), amostras com halo de inibição de crescimento para cefoxitina com diâmetro  $\leq 21$  mm são classificadas como resistentes, enquanto que amostras com halo  $\geq 22$  mm são consideradas sensíveis a este antimicrobiano.

**Tabela 9.** Perfil de susceptibilidade das sete amostras de *Staphylococcus aureus* albergando o gene *mecA* e que mostraram-se sensíveis à oxacilina pelos testes fenotípicos.

Amostra	Tipo de SCC <i>mec</i>	CMI <sup>1</sup> de oxacilina (µg/mL)	Medida do halo de inibição <sup>2</sup>
10	Não tipada	1,0	22 mm
34	IV	2,0	20 mm
38	IV	2,0	20 mm
79	IV	2,0	21 mm
101	IV	1,0	22 mm
102	IV	2,0	22 mm
114	IV	2,0	20 mm

1- CMI - concentração mínima inibitória; 2 - Tamanho do diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano no teste de difusão a partir do disco de cefoxitina;

A Tabela 10 apresenta a comparação das três técnicas de determinação de susceptibilidade à oxacilina realizadas no presente estudo. Nota-se que os resultados dos testes fenotípicos (difusão a partir do disco e teste de diluição em ágar) detectaram um número menor de amostras resistentes em comparação ao teste de detecção do gene *mecA*, cuja técnica é considerada o padrão-ouro para determinação da resistência à oxacilina.

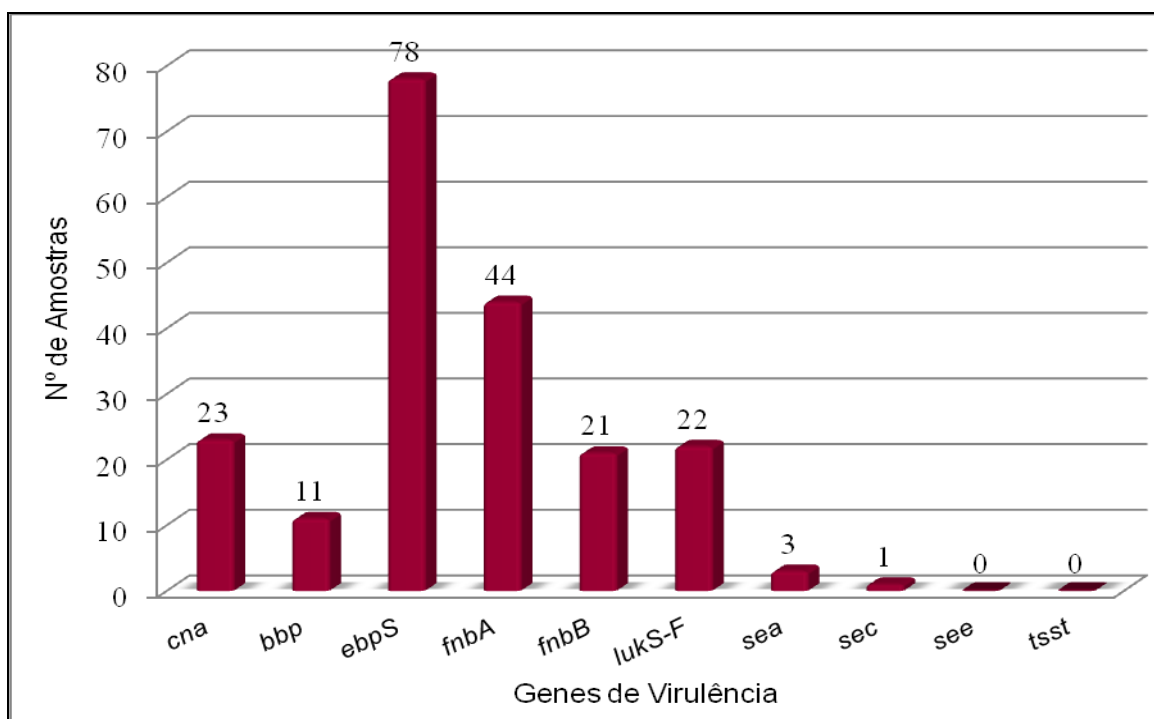
**Tabela 10.** Comparação entre os métodos utilizados para a detecção da resistência à oxacilina nas 100 amostras deste estudo

Método de detecção de resistência à oxacilina	Susceptibilidade à oxacilina	
	Nº de amostras resistentes	Nº de amostras sensíveis
Difusão a partir do disco	53	47
Teste de diluição em ágar	52	48
PCR (gene <i>mecA</i> ) <sup>1</sup>	59	41

1- a detecção do gene *mecA* por reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerado o método padrão-ouro para determinação da susceptibilidade à oxacilina.

## 5.6 Detecção de genes de virulência

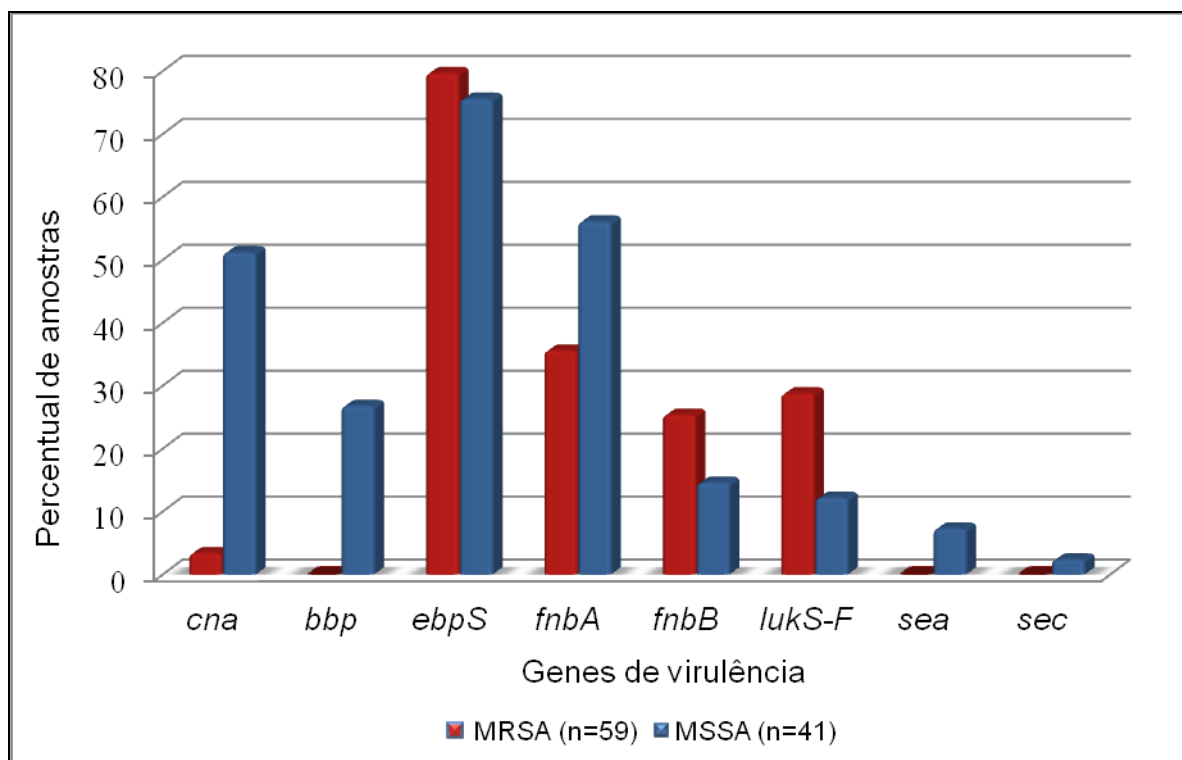
O Gráfico 5 apresenta a presença dos genes de virulência nas amostras deste estudo. O gene *ebpS* foi o mais prevalente, sendo encontrado em 78 das 100 amostras analisadas. O gene *fnbA* foi o segundo mais prevalente, sendo detectado em 44 amostras, seguido pelos genes *cna*, *lukS-F* e *fnbB* presentes em 23, 22 e 21 amostras, respectivamente. O gene *bbp* esteve presente em 11 amostras, ao passo que os genes *sea* e *sec* foram detectados apenas em amostras de MSSA. O gene *sea* mostrou-se presente em três amostras, enquanto que o gene *sec* foi detectado em apenas uma amostra. Além disso, em nenhuma das 100 amostras de *S. aureus* foi verificada a presença dos genes *see* e *tsst*.



**Gráfico 5.** Presença dos genes de virulência investigados nas 100 amostras de *Staphylococcus aureus* do presente estudo.

Ao comparar a incidência dos genes de virulência nas amostras de MSSA e MRSA em termos percentuais (Gráfico 6) foi observado que os genes *cna* (51% versus 3%, respectivamente), *fnbA* (56% versus 36%) e *bbp* (27% versus 0%) foram mais presentes nas amostras sensíveis à meticilina. Por outro lado, os genes *fnbB* (15%

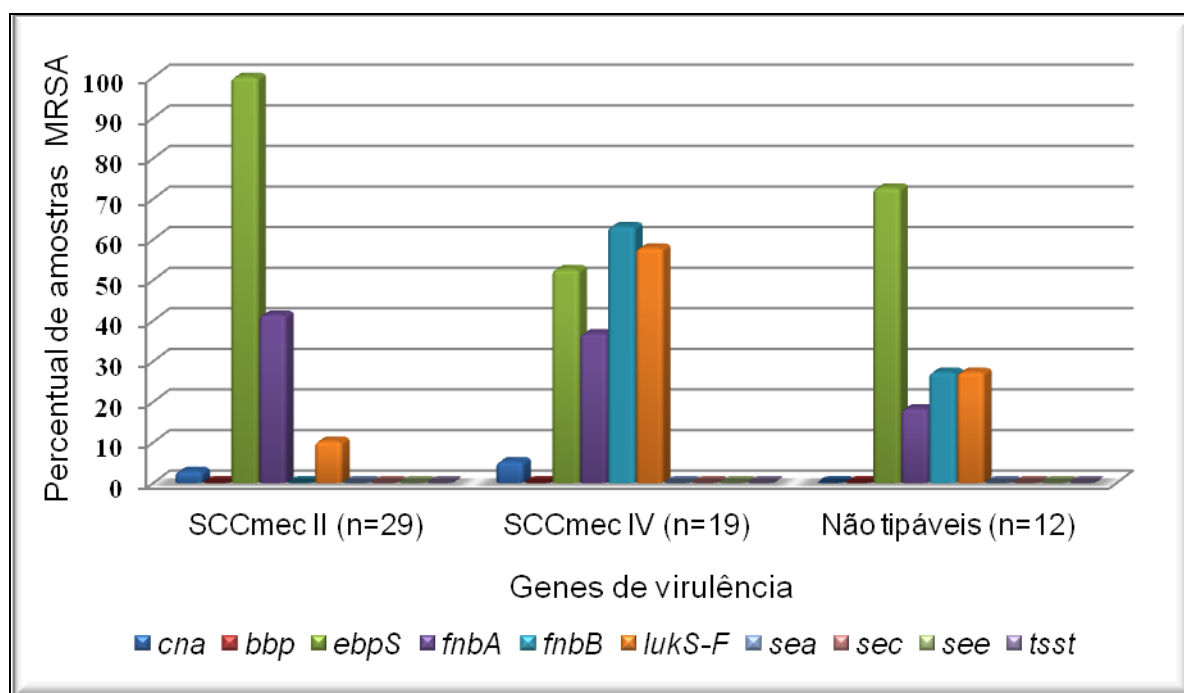
versus 25%) e *lukS-F* (12% versus 36%) mostraram-se mais presentes nas amostras resistentes à meticilina.



**Gráfico 6.** Comparação da presença dos genes de virulência nas amostras *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em relação às amostras *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA).

O Gráfico 7 e a Tabela 11 exibem a frequência dos genes de virulência de acordo com os tipos de SCCmec das amostras. O gene *ebpS* foi encontrado em todas as 29 amostras com o SCCmecII enquanto que nas amostras com SCCmecIV e não tipáveis foi encontrado em 10 (52,8%) e oito (72,7%) amostras, respectivamente. Nas amostras com o SCCmecIV, os genes *fnbB* e *lukS-F* foram os mais prevalentes, estando presente, respectivamente, em 63% e 58% das amostras. De modo distinto, nas cepas com SCCmecII, o gene *fnbB* não foi detectado, enquanto que o gene *lukS-F* foi encontrado em três (10,3%) amostras. Nas amostras não tipáveis, a incidência dos genes *fnbA* e *lukS-F* correspondeu a 18,2% (duas amostras) e 27,3% (três amostras), respectivamente.

O gene *fnbA* foi detectado em 12 (41,4%), sete (36,8%) e duas (18,2%) amostras apresentando os SCCmecII, SCCmecIV e não tipáveis, respectivamente. O gene *cna* foi detectado em apenas duas amostras de MRSA, uma com SCCmecII e uma com o SCCmecIV, enquanto que os genes *bbp*, *sea*, *sec*, *see* e *tsst* não foram detectados em nenhuma estirpe de MRSA do presente estudo.



**Gráfico 7.** Frequência da presença dos genes de virulência testados nas 59 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) de acordo com os tipos de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCCmec) detectados

**Tabela 11.** Presença dos genes de virulência de acordo com o perfil de resistência à meticilina e o genótipo das 100 amostras *S. aureus* estudadas.

Amostras	Nº (%) de amostras portadoras de genes de virulência									
	<i>cna</i>	<i>bbp</i>	<i>ebpS</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>lukS-F</i>	<i>sea</i>	<i>sec</i>	<i>See</i>	<i>tsst</i>
MRSA										
SCCmecII (n=29)	01 (2,9)	0	29 (100,0)	12 (41,4)	0	03 (10,3)	0	0	0	0
SCCmecIV (n=19)	01 (5,3)	0	10 (52,6)	07 (36,8)	12 (63,2)	11 (57,9)	0	0	0	0
Não tipáveis (n=11)	0	0	08 (72,7)	02 (18,2)	03 (27,3)	03 (27,3)	0	0	0	0
Total MRSA (n=59)	02 (3,4)	0	47 (79,7)	21 (35,6)	15 (25,4)	17 (28,8)	0	0	0	0
MSSA (n=41)	21 (51,2)	11 (26,8)	31 (75,6)	23 (56,1)	06 (14,6)	05 (12,2)	03 (7,3)	01 (2,4)	0	0
<b>Total (n=100)</b>	<b>23 (23,0)</b>	<b>11 (11,0)</b>	<b>78 (78,0)</b>	<b>44 (44,0)</b>	<b>21 (21,0)</b>	<b>22 (22,0)</b>	<b>03 (3,0)</b>	<b>01 (1,0)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

\* MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina

De acordo com testes de significância estatística (Tabela 12) os genes de virulência *cna*, *bbp* e *fnbA* mostraram-se, significativamente, mais prevalentes nas amostras de MSSA, enquanto que o gene *lukS-F*, codificador da Leucodicina de Panton-Valentine (PVL), foi mais prevalente nas amostras de MRSA. Por outro lado, não houve diferença significativa na prevalência dos genes *ebpS*, *fnbB*, *sea* e *sec* entre as amostras clínicas de MRSA e MSSA avaliadas neste estudo.

**Tabela 12.** Prevalência dos genes de virulência comparando os grupos de *Staphylococcus aureus* resistentes e sensíveis à meticilina.

Gene de virulência	Teste qui-quadrado (X <sup>2</sup> )	valor-p	Correção de Yates	Prevalência significativa (MRSA x MSSA)
<i>cna</i>	31,247	< 0,0001	não	MSSA
<i>bbp</i>	15,151	< 0,0001	sim	MSSA
<i>ebpS</i>	0,231	0,6305	não	insignificante
<i>fnbA</i>	4,127	0,0422	não	MSSA
<i>fnbB</i>	1,697	0,1926	não	insignificante
<i>lukS-F</i>	3,893	0,0485	não	MRSA
<i>sea</i>	2,291	0,1301	sim	insignificante
<i>sec</i>	0,034	0,8541	sim	insignificante
<i>see</i>	-	-	-	-
<i>tsst</i>	-	-	-	-

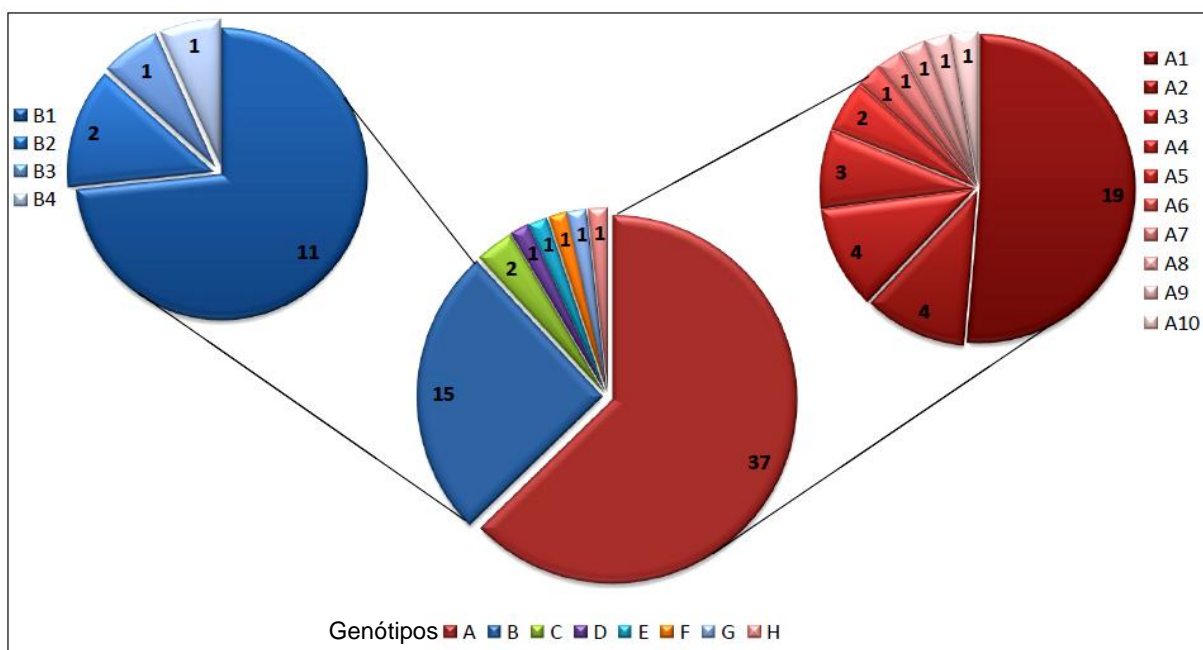
\* nível de significância  $\alpha = 0,05$ ; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina.



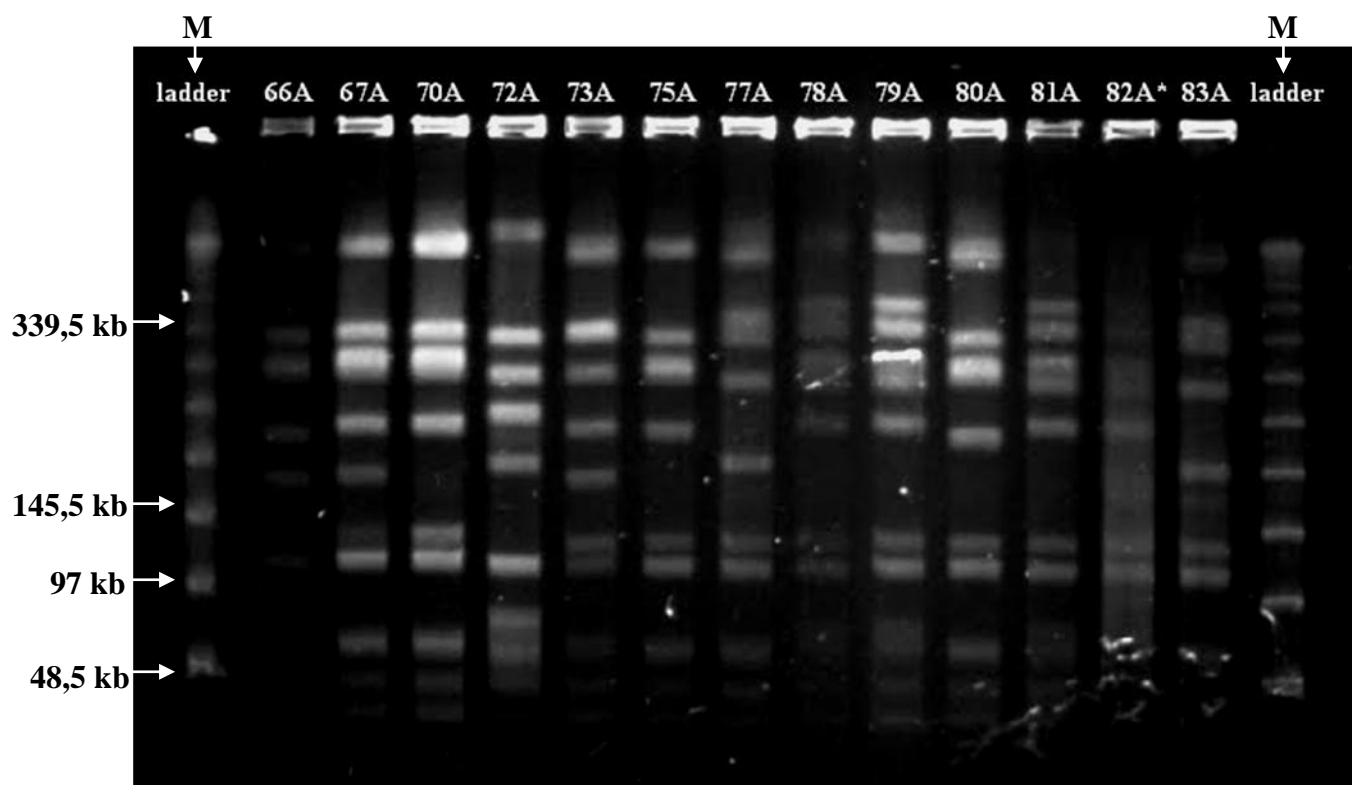
### 5.7 Genotipagem das amostras de MRSA a partir da análise do padrão de fragmentação do DNA cromossômico após uso de enzima de restrição e visualização por eletroforese de campo pulsado (PFGE)

Através desta técnica (Figura 8), foi possível identificar a presença de oito genótipos distintos entre as 59 amostras de MRSA, nomeados de A até H conforme demonstra o Gráfico 8.

O genótipo A apresentou o maior número de amostras (37), estando inclusas todas as 29 amostras albergando o *SCCmecII* e mais oito amostras não tipáveis. Neste genótipo foram detectados oito subtipos: A1 (19 amostras), A2 (04), A3 (04), A4 (03), A5 (02), A6 (01), A7 (01) e A8 (01). O segundo genótipo com maior número de amostras foi o genótipo B, englobando 15 amostras, sendo 12 com *SCCmecIV* e três não tipáveis. No genótipo B foram identificados quatro subtipos: B1 (11 amostras), B2 (02), B3 (01), B4 (01). Outras sete amostras, que apresentaram o *SCCmecIV*, corresponderam aos demais genótipos identificados. Duas amostras estão presentes no genótipo C, enquanto que cada um dos outros genótipos (D, E, F, G e H) possuem apenas uma amostra cada.



**Gráfico 8.** Genótipos das amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina obtidos por meio da análise do padrão de fragmentação do DNA cromossomal e separação por eletroforese de campo pulsado (PFGE). \*O número dentro das áreas do gráfico indica o número de amostras presentes em cada subtipo.



**Figura 8.** Foto ilustrativa da eletroforese de campo pulsado (PFGE) evidenciando os padrões de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina. Amostras com genótipo A: 66A, 67A, 70A, 73A e 75A; amostras com genótipo B: 78A, 79A, 80A, 81A, 82A e 83A; amostras com genótipo C: 77A; amostras com genótipo E: 72A. M - marcado molecular.

### 5.8 Relação entre os genótipos de MRSA detectados e a presença dos genes de virulência.

A Tabela 13 correlaciona os genótipos detectados nas amostras de MRSA e o perfil de virulência das mesmas. Foi observada a existência de nove perfis de virulência distintos entre as 59 amostras de MRSA. As 37 amostras com o genótipo A (*SCCmecII*) apresentaram quatro perfis de virulência distintos (P1, P2, P3 e P4), enquanto que as 15 amostras com o genótipo B (*SCCmecIV*) apresentaram outros quatro perfis de virulência (P4, P5, P6 e P7), ao passo que a única amostra do genótipo E apresentou o nono perfil de virulência (P9). As demais amostras, correspondentes aos genótipos C, D, F, G e H (todas com *SCCmecIV*) apresentaram dois perfis de virulência, encontrados também no genótipo A (P1 e P2).

Todos os nove perfis de virulência (P1 a P9) identificados neste estudo demonstraram a presença de um a três genes de virulência. O perfil P1, caracterizado apenas pela presença do gene *ebpS*, se mostrou o mais prevalente, estando presente em 24 amostras dos genótipos A, C, G e H. Caracterizado pela presença dos genes *ebpS* e *fnbA*, o perfil P2 foi o segundo mais prevalente, sendo detectado em 14 amostras dos genótipos A, D e F. O gene de maior prevalência foi o gene *ebpS*, estando presente em seis perfis de virulência distintos (P1, P2, P3, P4, P7 e P9), totalizando 47 amostras. O gene *lukS-F*, responsável pela expressão da Leucocidina de Panton-Valentine (PVL), esteve presente em quatro perfis de virulência distintos (P3, P5, P6 e P7) e presentes em amostras de MRSA dos genótipos dominantes: A e B (nos subtipos A1, A2, A4, B1, B2, B3 e B4).

Os perfis de virulência P4 e P9, encontrados apenas nos subtipos A5 e B3, incluíram o gene *cna*, detectado em apenas duas amostras de MRSA (uma com *SCCmecII* e outra com *SCCmecIV*)

Notoriamente, amostras dos genótipos A, C, D, F, G e H apresentaram perfis de virulência semelhantes, caracterizadas, principalmente, pela presença do gene *ebpS* e *fnbA*, diferentemente das cepas do genótipo B, as quais foram caracterizadas pela presença do gene *fnbB* e *lukS-F*. O gene *fnbB* foi encontrado apenas no genótipo B (*SCCmecIV*), de modo que os perfis de virulência P5 a P8 mostraram-se específicos às amostras desse genótipo.

**Tabela 13.** Correlação entre os genótipos encontrados e o perfil de virulência das amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina deste estudo.

Genótipo	Pulsotipo (Nº de amostras)	Perfil (Nº de amostras)	Genes de virulência*									
			<i>cna</i>	<i>bbp</i>	<i>ebpS</i>	<i>fnbB</i>	<i>fnbA</i>	<i>lukS-F</i>	<i>sea</i>	<i>tsst</i>	<i>sec</i>	<i>see</i>
A (37)	A1 (19)	P1 (10)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		P2 (07)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
		P3 (02)	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	A2 (04)	P1 (01)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		P2 (02)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
		P3 (01)	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	A3 (04)	P1 (02)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		P2 (02)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	A4 (03)	P1 (02)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		P3 (01)	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	A5 (02)	P1 (01)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		P4 (01)	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	A6 (01)	P2 (01)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	A7 (01)	P1 (01)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	A8 (01)	P1 (01)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	A9 (01)	P1 (01)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	A10 (01)	P1 (01)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B (15)	B1 (11)	P5 (04)	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
		P6 (03)	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
		P7 (03)	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
		P8 (01)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	B2 (02)	P5 (01)	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
		P8 (01)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	B3 (01)	P5 (01)	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
B4 (01)	P6 (01)	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
C (02)	C1 (02)	P1 (02)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
D (01)	D1 (01)	P2 (01)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
E (01)	E1 (01)	P9 (01)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
F (01)	F1 (01)	P2 (01)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
G (01)	G1 (01)	P1 (01)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
H (01)	H1 (01)	P1 (01)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	

\* o símbolo “+” indica presença do gene de virulência, enquanto que o símbolo “-” refere-se à ausência do mesmo.

## 6 DISCUSSÃO

*Staphylococcus aureus* é considerado o agente etiológico mais frequente em casos de infecções associadas aos cuidados de saúde (IRAS) no Brasil e no mundo. A sua versatilidade em adquirir genes de virulência e de resistência lhes confere notória habilidade para desenvolver infecções de gravidades variáveis. Em decorrência disso, os *S. aureus* são comumente agentes causadores de um amplo espectro de doenças, sendo responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade nos hospitais públicos e privados do país. Diante disso, estudos de caracterização deste microrganismo e seus mecanismos de resistência mostram-se imprescindíveis para contribuir para a saúde pública, desde em nível local até mesmo mundial.

No Brasil, *S. aureus* é a espécie bacteriana mais comumente isolada a partir de diversos sítios de infecções (GALES *et al.*, 2009). A maioria das estirpes de nosso estudo é originária de infecções de lesões cutâneas e de secreção de infecções diversas (45), entretanto, o número de amostras isoladas a partir de infecções de corrente sanguínea (41) mostraram que este foi o principal sítio de isolamento. De modo similar, outros estudos também apontam alta incidência de infecções de corrente sanguínea causadas por *S. aureus*. Um boletim informativo, publicado em dezembro de 2014 pela Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) aponta que *Staphylococcus aureus* é a espécie bacteriana mais frequente em casos de bacteremias no Brasil, estando presente em 14,5% dos casos (ANVISA, 2014). Bacteremias por *S. aureus* mostram-se alarmantes devido a dispersão deste patógeno no organismo hospedeiro, podendo ocasionar infecções em sítios anatômicos distantes (BANNERMAN, 2003).

Ainda não existe na literatura dados que resumam as taxas de mortalidade em pacientes com bacteriemia por *S. aureus* no Brasil, contudo, são reportados altos índices em estudos locais: PORTO *et al.* (2013) detectou uma taxa de mortalidade de 67% (30/45) em pacientes com bacteriemia por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. De modo similar, um estudo com pacientes submetidos à hemodiálise em São Paulo, realizado por GROTHE *et al.* (2010) relata que, dentre 156 pacientes analisados, 94

adquiriram bacteriemia e desses, 27 desenvolveram endocardite, dos quais, 15 foram a óbito.

No presente estudo, mais de 50% das amostras de *S. aureus* apresentaram resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos testados. Este resultado corrobora dados de outros estudos de vigilância epidemiológica que evidenciam que os MRSA correspondem de 30% a 60% dos casos de IRAS causadas por *S. aureus* no Brasil (ROSSI, 2011; STEFANI *et al.*, 2012; ANVISA, 2014).

Os tipos de SCCmec detectados com maior frequência em amostras de *S. aureus* são: I, II, III e IV (CHAMBERS *et al.*, 2007). Comumente, os MRSA associados aos cuidados de saúde (HA-MRSA) carregam o SCCmec tipo I, II ou III, enquanto que os MRSA adquiridos na comunidade (CA-MRSA), normalmente, albergam os tipos IV e V (DEURENBERG *et al.*, 2007; TRISTAN *et al.*, 2007).

No Brasil, até algumas décadas atrás, o Clone Endêmico Brasileiro (CEB), carreador do SCCmecIII, mostrava-se o mais prevalente, correspondendo cerca de 70% dos MRSA isolados nos hospitais brasileiros (VIVONI *et al.*, 2006). Um estudo de MARTINS *et al.* (2014) realizado em 46 amostras de MRSA isoladas entre 2002 e 2006 no Hospital Universitário de Botucatu (São Paulo) revelou a prevalência do SCCmecIII em 90% das amostras, e do SCCmec tipo IV em 10% destas. De modo similar, o estudo realizado por PEREIRA *et al.* (2014) também evidenciou a prevalência do SCCmecIII em MRSA isolados em hospitais brasileiros, de modo que dentre 119 estirpes analisadas, 21 eram MRSA, sendo nove amostras com SCCmecIII e 12 com SCCmecIV. Em contraste a estes estudos, nenhuma amostra de MRSA com SCCmecIII foi identificada em nosso estudo, sendo detectados apenas os SCCmecII (n=29) e IV (n=19) dentre as 59 amostras estudadas. No estudo CAIAFFA-FILHO *et al.* (2013) o número de cepas de MRSA com o SCCmecII foi mais frequente que o CEB em casos de bacteriemias nosocomiais. Estes estudos revelam uma real mudança na prevalência dos clones epidêmicos no Brasil no qual cepas carreadoras do SCCmecII e IV mostram-se cada vez mais presentes (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Devido a limitações no teste de tipagem do SCCmec, 11 amostras de MRSA do presente estudo foram determinadas como não tipáveis devido à amplificação de

bandas inespecíficas ou pela não amplificação de genes do *SCCmec*. Além disso, o fato de haver amostras não tipáveis pode estar relacionado com a técnica utilizada, já que o teste de tipagem realizado neste estudo permite a identificação apenas dos *SCCmec* dos tipos I a VI.

Ao correlacionar os tipos *SCCmec* detectados nas amostras de MRSA e seus respectivos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos não beta-lactâmicos foi verificado que as amostras com o *SCCmecII* e as não tipáveis apresentaram maiores taxas de resistência a uma maior quantidade de antimicrobianos não beta-lactâmicos em comparação às amostras com *SCCmecIV*. O perfil de susceptibilidade das amostras *SCCmecII* mostra-se semelhante às amostras com o *SCCmecIII*, as quais, geralmente, apresentam sensibilidade a poucas classes de antimicrobianos (CABOCLO *et al.*, 2013). De acordo com PALLIN *et al.* (2008) cepas com *SCCmecIV* comumente são sensíveis a clindamicina, rifampicina, tetraciclina e trimetroprima/sulfametoxazol (TMP/STX). Em nosso estudo, amostras com o *SCCmecIV* foram sensíveis a estes antimicrobianos, estando também em concordância com os estudos de LIMA *et al.* (2014) e CAVALCANTE *et al.* (2014)..

Mais de 50% das amostras de MRSA de nosso estudo apresentaram resistência a eritromicina, ciprofloxacina e norfloxacin. Além disso, amostras com o *SCCmecII* e não tipáveis mostraram-se resistentes à clindamicina. Do mesmo modo, PENA *et al.* (2014) ao avaliarem o perfil de resistência aos antimicrobianos em MRSA de hospitais de Goiânia constatou que mais de 50% das amostras eram resistentes a esses mesmos antimicrobianos. Estes dados evidenciam um alto índice de resistência a antimicrobianos que são rotineiramente utilizados na prática clínica, o que se torna alarmante, pois o uso de antibioticoterapia de amplo espectro pode favorecer a seleção de amostras resistentes, além de elevar os custos do tratamento (MARRA *et al.*, 2009).

Todas as amostras de *S. aureus* do presente estudo apresentaram sensibilidade à linezolida. De modo similar, outros estudos também têm detectado altas taxas de sensibilidade à linezolida em estirpes nosocomiais de MRSA (CAIFFA-FILHO *et al.* 2013; CABOCLO *et al.* 2013; GALES *et al.* 2009). Em decorrência disso, a linezolida é um antimicrobiano comumente utilizado no tratamento de diversas infecções

nosocomiais por MRSA, como pneumonia, infecções de pele e tecidos moles (WEIGELT *et al.* 2005).

Com exceção de uma amostra, todas as amostras de MRSA foram sensíveis à tetraciclina e TMP/STX. Diversos estudos comprovam que, comumente, amostras apresentando o SCC*mecII* e IV apresentam grande sensibilidade a estes antimicrobianos, enquanto que os MRSA com SCC*mecIII* são majoritariamente resistentes (CAVALCANTE *et al.*, 2014; CAIFFA-FILHO *et al.* 2013; CABOCLO *et al.* 2013). Alguns autores vêm sugerindo que o uso de tetraciclina e de TMP/STX podem funcionar como alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções associadas a *Staphylococcus aureus* adquiridos na comunidade (CA-MRSA) carreadores do SCC*mecIV*, assim como infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRSA), mas suscetíveis a TMP/STX (BORDON *et al.*, 2010; RUHE *et al.*, 2007; SIEVERT *et al.*, 2008).

Quarenta e oito amostras de *Staphylococcus aureus* apresentaram concentração mínima inibitória (CMI) de oxacilina menor que o ponto de corte, variando de 0,5 a 2,0 µg/mL. Entretanto, destas amostras, sete eram portadoras do gene *mecA*, sendo seis amostras com o SCC*mecIV* e uma não tipada. Em todas as sete amostras o halo de inibição de crescimento bacteriano utilizando o disco de cefoxitina apresentou diâmetro próximo ao ponto de corte (22 mm). Ao investigar a ocorrência deste resultado na literatura, foi verificado comportamento semelhante em amostras de *S. aureus* isoladas em Taiwan, onde dentre 3.160 amostras testadas, 58 apresentavam o gene *mecA* e CMI de oxacilina menor ou igual a 2,0 µg/mL. Destas, 52 amostras apresentaram o SCC*mecV* e seis o SCC*mecIV* (CHEN *et al.* 2012). Além disso, segundo OKUMA *et al.* (2002) cepas de MRSA com SCC*mecIV* muitas vezes não são detectadas na rotina dos laboratórios por apresentarem CMI de oxacilina próximo ao ponto de corte. Estes dados destacam a limitação dos testes fenotípicos de sensibilidade utilizados na prática clínica para a detecção dos MRSA. Sendo assim, a identificação das amostras de MRSA por meio da detecção do gene *mecA* mostra-se o melhor caminho para assegurar a acurácia dos resultados e evitar falsos negativos.

Apesar de já terem sido reportadas amostras clínicas de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) no Brasil, este perfil de resistência ainda é incomum (LUNA *et*



*al.*, 2010). No presente estudo, todas as 100 amostras mostraram-se sensíveis à vancomicina. Mesmo diante de baixos valores de CMI para vancomicina, o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* com este antimicrobiano sempre requer cautela, não somente pela sua toxicidade, mas também por terem sido reportados casos de amostras de *S. aureus* com resistência intermediária (VISA) ou com heterorresistência (hVISA) à vancomicina nas quais as falhas terapêuticas se mostraram recorrentes (MELLO *et al.*, 2009). Um trabalho que correlacionou as CMIs desse fármaco com sua eficácia clínica em 87 pacientes com pneumonia por *S. aureus* mostrou que nas amostras com CMI menor ou igual a 1,0 µg/mL a falha do tratamento ocorreu em 22 pacientes, enquanto que em 23 pacientes, cujas amostras apresentavam CMI de 2,0 µg/mL, também ocorreu falha no tratamento, totalizando assim, 45 casos de falhas terapêuticas com o uso de vancomicina no tratamento de amostras sensíveis *in vitro* a este fármaco (MOISE-BRODER *et al.*, 2004). Recentemente, um estudo similar que analisou a eficácia da terapia com vancomicina em 85 pacientes com pneumonia por MRSA que apresentavam CMI ≤ 2,0 µg/mL, verificou que 36 destes pacientes não obtiveram sucesso terapêutico com este antimicrobiano e foram a óbito (MACHADO *et al.*, 2013).

Além dos genes de resistência aos antimicrobianos, os genes de virulência também contribuem diretamente para a patogenicidade das cepas de *S. aureus* por exercerem papel fundamental em permitir a adesão, a invasão e a permanência deste patógeno no organismo hospedeiro (ZECCONI & SCALI, 2013). No presente estudo, a detecção dos principais genes de virulência associados aos *S. aureus* permitiu caracterizar os perfis de virulência destas cepas.

Os genes de virulência mais prevalentes foram os genes associados à expressão de adesinas: *ebpS* (78%) e *fnbA* (44%). O gene *ebpS* é responsável pela expressão da proteína de ligação à elastina que permite a adesão do patógeno a tecidos ricos em elasticidade, como pele, pulmão e vasos sanguíneos, enquanto que o gene *fnbA* codifica a proteína ligadora de fibronectina A, que promove a invasão do patógeno em diversos tecidos do hospedeiro (PARK *et al.*, 1996; GARZONI & KELLEY, 2009).

Um estudo realizado por SCHUENCK *et al.* (2012) investigou a presença de genes de virulência em 73 amostras clínicas de *S. aureus* isoladas a partir de dispositivos médicos no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (Rio de Janeiro). Neste

trabalho, os genes *ebpS* e *fnbA* também mostraram-se os mais prevalentes, sendo encontrados, respectivamente, em 73% e 88% das amostras, enquanto que os genes *fnbB* e *bbp* apresentaram prevalência de 17% e 10%, demonstrando padrão similar ao nosso estudo, cujas prevalências foram de 21% e 11%, respectivamente. Contudo, no trabalho destes autores o gene *fnbB* foi encontrado exclusivamente em amostras com o SCC*meclIII* similares ao Clone Epidêmico Brasileiro enquanto que no presente estudo este gene foi encontrado apenas em amostras de MRSA com SCC*meclIV*. Outra diferença relevante entre estes dois estudos foi a maior presença do gene *cna*, sendo detectado em 67% das amostras, ao passo que em nosso estudo a prevalência deste gene foi de apenas 23%. Possivelmente a incidência do gene *cna*, no referido trabalho, mostrou-se superior às relatadas em nosso estudo devido às fontes de isolamento utilizadas, tendo em vista o papel do gene *cna* em infecções associadas a dispositivos invasivos. PANIAGUA-CONTRERAS *et al.* (2014) detectaram 100% de presença do gene *cna* em 21 amostras de MRSA isoladas a partir de cateteres intravenosos.

No estudo realizado por RASMUSSEN *et al.* (2013) com 88 amostras de MRSA provenientes de infecções invasivas, os genes *ebpS* e *fnbA* também foram os mais prevalentes, estando presentes em 100% das amostras, enquanto que os genes *fnbB* e *bbp* foram encontrados em 71 e 78 amostras, respectivamente. Em semelhança ao nosso estudo, o gene *cna* foi um dos genes associados a expressão de adesinas menos prevalentes em amostras de MRSA, sendo detectado em 43 amostras clínicas. De modo geral, foi possível observar que a prevalência dos genes de adesinas pesquisados pode variar, consideravelmente, dependendo do tipo de infecção a qual as amostras foram isoladas. Além disso, alguns genes como *cna* e *fnbB* aparentam ser específicos de determinadas linhagens.

Ao investigar a presença de genes de virulência associados à expressão de importantes toxinas, foi verificada uma baixa prevalência destes em nossas amostras. Não foi detectada a presença dos genes *see* e *tsst* em nenhuma amostra, enquanto que os genes *sea* e *sec* apresentaram uma prevalência de apenas 3 e 1% respectivamente. Um estudo realizado por CHEN *et al.* (2013) em 108 amostras (46 MSSA e 62 MRSA) associadas a bacteremias também não detectou amostras portadoras dos genes *see*. Por outro lado, a prevalência dos genes *tsst*, *sea*, *sec* foram de 12%, 20% e 15%, respectivamente, sendo mais elevadas que em nosso

estudo. Em outro estudo, realizado por SINA *et al.* (2013), com 136 amostras de *S. aureus* provenientes de infecções diversas, verificou que a incidência dos genes *see* e *tsst* foi de 0,8 e 1,0%, enquanto que os genes *sea* e *sec* se mostraram presentes em 32 e 0,6% das amostras. De um modo geral, os dados apresentados por este e outros estudos evidenciam uma baixa prevalência destes genes em amostras nosocomiais de *S. aureus*. Em geral o gene codificador da enterotoxina A (*sea*) tem sido detectado em incidência inferior a 50%, enquanto que os genes responsáveis pela expressão das enterotoxinas C (*sec*) e E (*see*), e da toxina da síndrome do choque tóxico (*tsst*) continuam sendo encontrados em prevalência inferior a 20% (VERKAİK *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2014; SABOUNI *et al.*, 2014).

O gene *lukS-F* responsável pela expressão da Leucocidina de Panton-Valentine (PVL) foi detectado em 22 amostras de *S. aureus*, sendo 17 MRSA e cinco MSSA. Dentre as 17 amostras de MRSA portadoras do gene *lukS-F*, onze albergam o SCCmec IV, três o SCCmecII e outras três foram não tipáveis. No estudo de CAVALCANTE *et al.* (2012) foi detectada a presença deste gene em três dentre 20 amostras de MRSA oriundas do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Rio de Janeiro), além disso, todas as três amostras albergavam o SCCmec IV, sendo duas dessas de origem comunitária. Similarmente, um estudo realizado por BRUST *et al.* (2013) avaliando a colonização nasal de 80 pacientes internados em um Hospital Geral de Niterói (RJ) detectou 16 amostras de *S. aureus*, sendo 13 resistentes à meticilina. Todas as amostras de MRSA apresentaram o SCCmecIII e as 16 amostras apresentaram o gene da PVL. Em um recente estudo, LIMA *et al.* (2014) encontraram o gene da PVL em 13 de 28 amostras de MRSA isoladas em crianças com fibrose cística, no qual cinco (38,4%) amostras apresentaram o SCCmecIV, três (23%) o SCCmecII, duas (15,3%) o tipo I e duas (15,3%) amostras apresentaram o SCCmec não tipável. GELATTI *et al.* (2013) analisaram, em um hospital de Porto Alegre, 58 amostras de *S. aureus*, sendo cinco (8,6%) destas amostras caracterizadas como CA-MRSA e, dessas, três (60%) amostras albergavam o gene da PVL e apresentavam SCCmecIV.

A existência de amostras clínicas de *S. aureus* portadoras do gene *lukS-F* nos hospitais investigados neste estudo revela-se um dado relevante, pois, infecções causadas por estas cepas, normalmente, apresentam maior severidade em decorrência do papel pró-inflamatório e citolítico da PVL, sendo comumente

associadas a infecções de pele e tecidos moles, assim como infecções invasivas e graves, como sepse e pneumonia necrotizante. Esta última tem sido frequentemente associada aos CA-MRSA produtores de PVL em vários países, apresentando uma alta taxa de mortalidade (GILLET *et al.*, 2002, SHALLCROSS *et al.* 2013 e CHEN *et al.* 2014).

Apesar de os testes estatísticos terem evidenciado que o grupo das amostras de MSSA deste estudo são mais virulentas que as MRSA, ainda não há consenso, na literatura, se os MRSA ou os MSSA tendem a ser o grupo de maior virulência, diante da aleatoriedade destes resultados em estudos similares ao nosso. Entretanto, alguns autores afirmam a facilidade na aquisição de genes de virulência em cepas *S. aureus* que apresentam menos genes de resistência em seu genoma, especialmente em cepas de MSSA e de MRSA com *SCCmec* menores (COLLINS *et al.*, 2010; JIMENEZ *et al.*, 2011).

A análise da diversidade clonal das 59 amostras de MRSA do presente estudo revelou a presença oito genótipos, nomeados de A até H, cujas amostras apresentaram nove perfis de virulência distintos.

Ainda são escassas na literatura nacional publicações que correlacionem genótipos detectados em análise por PFGE e seus respectivos perfis de virulência. Ao comparar nossos resultados com o estudo realizado por SCHUENCK *et al.* (2012), foi observada uma menor prevalência de genes de virulência nos perfis do nosso estudo, sendo encontrados de um a três genes por perfil, ao passo que no trabalho destes autores os perfis apresentavam de três a seis genes de virulência. Além disso, em nosso estudo foi observado que no genótipo das amostras com *SCCmecIV* houve predomínio dos genes *fnbB* e *lukS-F* enquanto que no outro estudo os genes *cna*, *fnbA* e *ebpS* mostraram-se mais presentes. Outra diferença relevante entre os dois estudos foi que neste trabalho o gene *fnbB* foi encontrado apenas em amostras com o *SCCmecIV* enquanto que no estudo daqueles autores esse gene foi específico de amostras com *SCCmecIII*.

Um estudo epidemiológico feito por RODRÍGUEZ *et al.* (2014) em 159 amostras de *S. aureus* provenientes de colonização nasal de pacientes de zero a cinco anos de idade detectou 21 amostras de MRSA, sendo 12 com *SCCmecIV* e nove não

tipáveis distribuídas em seis complexos clonais. Neste trabalho o gene PVL mostrou-se o mais prevalente, estando presente em 16 cepas, seguido pelo gene *tsst*, detectado em 13 cepas. Os demais genes de virulência associados à expressão de enterotoxinas, como *sea*, *seb*, *sec* e *see* apresentaram baixa prevalência. Diferentemente de nosso trabalho, os genes associados à adesinas não foram investigados nesta pesquisa. Outro estudo similar, realizado por PANIAGUA-CONTRERAS *et al.* (2014), com 21 amostras clínicas de MRSA (três com SCC*mecl*, seis com SCC*mecl*I e 12 com SCC*mecl*IV) provenientes de infecções relacionadas a cateter foram divididas em 15 genótipos distintos, apresentando dez perfis de virulência. No referido trabalho, foi detectada uma alta prevalência de genes de adesinas em todos os MRSA pesquisados: todas as amostras apresentaram os genes *cna* e *bbp*, enquanto que os genes *ebpS*, *fnbA* e *fnbB* apresentaram taxas de prevalência de 90, 90, e 80% respectivamente. Os genes associados a toxinas não foram avaliados.

Em nosso estudo, o genótipo A foi identificado com maior prevalência, sendo composto por todas as 29 amostras de MRSA com SCC*mecl*II e mais oito amostras de MRSA não tipáveis, abrangendo 63% (n=37) do total de MRSA. Foram detectados 10 pulsotipos no genótipo A (A1 ao A10) entre os quais o pulsotipo A1 foi o mais prevalente, abrangendo 19 amostras. Todas as 19 amostras de MRSA com SCC*mecl*IV juntamente com outras três amostras não tipáveis foram encontradas nos outros genótipos, sendo o genótipo B o segundo mais prevalente, contendo 15 amostras. Assim, ficou caracterizada a circulação de dois genótipos dominantes nos hospitais pesquisados. Este pequeno número de genótipos circulantes nos hospitais estudados indica a necessidade de melhorias no sistema de vigilância e a adoção de medidas eficazes de controle que evitem a disseminação intra-hospitalar destes genótipos.

No estudo realizado por PEREIRA *et al.* (2014) foram detectados em três genótipos distintos em 21 estirpes de MRSA identificadas em infecções diversas em pacientes de uma UTI pediátrica (Botucatu – São Paulo). Nove destas amostras apresentaram o SCC*mecl*III e foram correlacionadas ao clone epidêmico brasileiro (CEB), e outras 12 amostras com o SCC*mecl*IV estavam associadas à dois clones CA-MRSA, um americano (USA800) e outro japonês (JCSC4469). Em contraste, não foram detectadas amostras carreadoras do SCC*mecl*III em nosso estudo, e por

consequência, não foram detectadas amostras relacionadas ao CEB dentre os 59 MRSA analisados.

Todas as amostras albergando o SCC*mecII* foram classificadas no mesmo genótipo, enquanto que as amostras com o SCC*mecIV* apresentaram uma maior diversidade genotípica por estarem distribuídos em sete genótipos distintos, indicando que a presença dos MRSA com SCC*mecIV* nas instituições de saúde pesquisadas possui origem policlonal. Essa diversidade genotípica característica das amostras com SCC*mecIV* também foi verificada em outros estudos (RODRIGUES *et al.*, 2013; SCHUENCK *et al.*, 2009; BARTELS *et al.*, 2007). De acordo com ROBINSON & ENRIGHT (2003) esta alta diversidade é causada não somente pela dispersão destes genótipos entre os pacientes, mas também pela disseminação de elementos SCC*mecIV* nos *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA).

Os resultados apresentados neste estudo evidenciam que é cada vez mais importante a realização de uma vigilância epidemiológica ativa nas instituições de saúde, objetivando a detecção e a caracterização de cepas de MRSA, não somente quanto aos tipos SCC*mec*, como também em relação aos genótipos e a presença de determinantes de virulência. O conhecimento da epidemiologia local dos principais agentes etiológicos das infecções associadas aos cuidados de saúde (IRAS) , assim como os *Staphylococcus aureus*, é imprescindível para o estabelecimento de medidas de prevenção e controle da disseminação destes microrganismos. Além disso, estes estudos epidemiológicos permitem identificar importantes mudanças no perfil de resistência aos antimicrobianos utilizados na prática clínica, compreendendo assim o perfil da população de microrganismos de cada hospital no intuito final de estabelecer medidas eficazes de combate às altas taxas de mortalidade e morbidade associadas às IRAS por *S. aureus* no Brasil.

## 7 CONCLUSÕES

- As amostras de MRSA deste estudo apresentaram um alto índice de resistência aos fármacos comumente utilizados na prática clínica como oxacilina, eritromicina, ciprofloxacina, norfloxacina, rifampicina e clindamicina.
- Foi verificada uma elevada taxa de sensibilidade das amostras de MRSA a trimetoprima/sulfametoxazol, tetraciclina e gentamicina, revelando-se importantes alternativas terapêuticas em infecções por este agente;
- Este estudo demonstrou a prevalência dos SCC*mec* tipo II e IV nas amostras de MRSA das instituições de saúde pesquisadas. Foi observada a ausência do Clone Epidêmico Brasileiro (SCC*mec*III) nos hospitais e no período pesquisados;
- Ficou evidente a limitação dos testes fenotípicos de sensibilidade aos antimicrobianos para a detecção de algumas cepas de MRSA comumente utilizados na rotina clínica, como o teste de determinação da concentração mínima inibitória e o teste de difusão a partir do disco de antimicrobiano.
- As amostras de MRSA do presente estudo revelaram-se pouco virulentas diante da existência de um número reduzido de genes nos perfis de virulência identificados.
- Os genes de virulência *ebpS* e *fnbA* mostraram-se os mais disseminados entre as amostras analisadas enquanto os genes associados à expressão de toxinas mostraram-se pouco frequentes ou ausentes;
- Os genes *cna*, *bbp* e *fnbA* apresentaram relevante prevalência nas amostras de MSSA, denotando maior virulência destas em comparação às MRSA estudadas.

- O gene da PVL mostrou-se mais frequente em amostras com o *SCCmecIV* (genótipo B), demonstrando uma característica de maior facilidade de se inserir em amostras que apresentam *SCCmec* menores;
- Houve a prevalência de dois genótipos dominantes (A e B) nos hospitais de nossa região em relação às amostras de MRSA analisadas.
- O perfil de virulência dos dois genótipos dominantes mostrou-se específico aos mesmos diante da dominância do gene *ebpS* no genótipo A e dos genes *fnbB* e *lukS-F* no genótipo B;
- Foi observada uma possível entrada de diferentes clones albergando o *SCCmecIV* nas instituições hospitalares analisadas em função da grande diversidade genotípica destas amostras.



## BIBLIOGRAFIA

AIRES DE SOUZA, M.; DE LANCASTRE, H.; SANTOS, S.; KIKUCHI, I.; TOTSUKA, K.; TOMASZ, A. **Similarity on a antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan.** Microbiol. Drug Resist., v. 6, p. 253-258, 2000.

AIRES DE SOUZA, M.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I.S.; AVILA, S.; ADAMNSON, I.; CASAGRANDE, S.T.; BRANDILEONE, M.C.; PALACIO, R.; DELL'ACQUA, L.; HORTAL, M.; CAMOU, M.; ROSSI, A.; VELAZQUEZ-MEZA, M.E.; ECHANIZ-AVILES, G.; SOLORZANO-SANTOS, F.; HEITMANN, I.; DE LANCASTRE, H. **Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998.** J. Clin. Microbiol., v. 39, p. 2197-2205, 2001.

ALMEIDA, G.C.M.; SANTOS, M.M.; LIMA, N.G.M.; CIDRAL, T.A.; MELO, M.C.N.; LIMA, K.C. **Prevalence and factors associated with wound colonization by *Staphylococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients in inland northeastern Brazil: a cross-sectional study.** BMC Infect. Dis., v. 14, n. 328, p. 1-8, 2014.

ANDRIOLO, A. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar.** São Paulo: Editora Manole, 2005.

ANSTEAD, G.M.; CADENA, J.; JAVERI, H. **Treatment of infections due to resistant *Staphylococcus aureus*.** Methods in Molecular Biology, v. 1085, p. 259-309, 2014.

ANVISA. **Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM.** Brasil, 10 jul. 2009. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede\\_rm/2009/100709\\_perfil\\_sensibilidade.htm](http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_perfil_sensibilidade.htm)>. Acessado em: 09 mar. 2015.

ANVISA. **Boletim Informativo: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**. Brasil, 2014, 41p.

ARCHER, G.L. ***Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen***. Clin. Infect. Dis., v. 26, p. 1179–1181, 1998.

BANNERMAN, T. L. A. & PEACOCK, S. J. ***Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci***. In: Manual of Clinical Microbiology, Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H., Landry, M. L. & Pfaller, M. A., 9<sup>th</sup> ed., ASM Press, Washington, D.C., v. 2, p. 390-411, 2007.

BANNERMAN, T. L. ***Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically***. In: Murray P. R.; Baron, E. J.; Jorgesen, J. H.; Pfaller, M.A.; Tenover, R. H. Manual of clinical microbiology, 8a ed. Washington (DC): ASM Press, v. 1, p. 384-404, 2003.

BARTELS, M.D.; BOYE, K.; LARSEN, A.R.; SKOW, R. & WESTH, H. **Rapid increase of genetically diverse methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Copenhagen, Denmark**. Emerg. Infect. Dis., v. 13, p. 1533-1540, 2007.

BASSET, P.; AMHIS, W.; BLANC, D.S. **Changing molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an Algerian hospital**. J. Infect. Dev. Ctries., v. 09, n. 2, p. 206-209, 2015.

BERGER-BACHI, B. & ROHRER, S. **Factors influencing methicillin resistance in *Staphylococci***. Arch. Microbiol., v. 178, p. 165 – 171, 2002

BONDI, J.A. & DIETZ, R.A. **Penicillin resistant staphylococci**. Proc. Royal. Soc. Exper. Biol. Med., v. 60, p. 55-58, 1945.

BONNAL, C.; BIRGAND, G.; LOLOM, I.; DIAMANTIS, S.; DUMORTIER, C.; L'HERITEAU, F.; ARMAND-LEFEVRE, L.; LUCET, J.C. **Staphylococcus aureus healthcare associated bacteraemia: An indicator of catheter related infections.** Med Mal Infect, p. 1-5, 2015.

BORDON, J.; MASTER, R.N.; CLARK, R.B.; DUWURI, P.; KARLOWSKY, J.A.; AYESU, K. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistance to non  $\beta$ -lactam antimicrobials in the United States from 19996 to 2008.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis., v. 67, p. 395-398, 2010.

BOYCE, J. M. **Coagulase-negative staphylococci.** In: Mayhall, C. G. (ed.). *Hospital Epidemiology and Infection Control*. Williams & Wilkins Company. Baltimore, USA, p. 306-334, 1996.

BRITO, C.S.; RIBAS, R.M.; RESENDE, D.S.; BRITO, D.V.D. ABDALLAH, V.O.S.; SANTOS, K.R.N.; CAVALCANTE, F.S.; MATOS, P.D.M.; FILHO, P.P.G. **Divergence in the pathogenesis of bloodstream infection related central venous catheters in neonates.** Braz. J. Infect. Dis. v. 18, n. 4, p. 387-393, 2014.

BRITO, D.V.D.; SOARES, J.P.; ABDALLAH, V.O.S.; FILHO, P.P.G. **Bacterimia por *S. epidermidis* em neonatos: incidência e fatores de risco.** Rev. Ciênc. Méd., v. 16, n. 2, p. 71-777, 2007.

BRUST, T; COSTA, T. M. DA; AMORIM, J. C; ASENSI, M. D; FERNANDE, O; AGUIAR-ALVES, F. **Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the PVL gene outbreak in a Public Hospital in Rio de Janeiro, Brazil.** Braz. J. Microbiol., v. 44, n. 3, p. 865-868, 2013.

BUKOWSKI, M.; WLADYKA, B.; DUBIN, G. **Exfoliative toxins os *Staphylococcus aureus*.** Toxins (Basel), v. 2, p. 1148-1165, 2010.

CABOCLO, R.M.; CAVALCANTE, F.S.; IORIO, N.L.; SCHUENCK, R.P.; OLENDZKI A.N.; CHAMON, R.C.; DOS SANTOS, K.R. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA 100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one.** Am. J. Infect. Control., v. 41, p. 21-26, 2013.

CAIFFA-FILHO, H.H.; TRINDADE, P.A.; DA CUNHA, P.G.; ALENCAR, C.S.; PRADO, G.V.B.; ROSSI, F.; LEVIN, A.S. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacterimia.** Diag. Microbiol. Infect. Dis., v. 76, p. 518-520, 2013.

CALIXTO, C.M.F; CAVALHEIRO, E.T.G. Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico no Desenvolvimento Científico, **Química Nova Interativa**, ago. 2012. Disponível em: <<http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=tema.63>>. Acessado em: 09 mar. 2015.

CAMPANILE, F.; BONGIORNO, D.; FALCONE, M.; VILATI, F.; PASTICCI, B.; PEREZ, M. **Changing Italian nosocomial–community trends and heteroresistance in *Staphylococcus aureus* from bacterimia and endocarditis.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., v. 31, n. 5, p. 739-745, 2011.

CASEWELL, M. W. & HILL, R. L. **Elimination of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* with mupirocin ("pseudomonic acid") – a controlled trial.** J. Antimicrob. Chemother., v. 17, p. 365-372, 1986.

CASEY, A. L.; WORTHINGTON, T.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. ***Staphylococci*.** Int. J. Antimicrob. Agents., v. 29, n. 3, p. 23-32, 2007.

CAVALCANTE, F.S.; SCHUENCK, R.P.; FERREIRA, D.C.; DA COSTAS, C.R.; NOUÉR, S.A.; DOS SANTOS, K.R.N. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: spread of specific lineages among patients in different wards at a Brazilian teaching hospital.** J. Hosp. Infect., v. 86, p. 151-154, 2014.

CAVALCANTI, S.; DE FRANÇA, E.R.; CABRAL, C.; VILELA, M.A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D.; MEDEIROS, A.C.R. **Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital**. Braz J Infect Dis, v. 9, n. 1, p. 56- 63, 2005.

CHAHOUD, J.; KANAFANI, Z.; KANJ, S.S. **Surgical site infections following spine surgery: eliminating the controversies in the diagnosis**. Frontiers in Medicine., v. 1, n. 7, p. 1-10, 2014.

CHAMBERS, H.F. **Methicillin resistance in *Staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications**. Clin. Microbial. Rev., v. 10, p. 781-191, 1997.

CHAMBERS, H.F. **The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?** Emerg. Infect. Dis., v. 7, p. 178-182, 2001.

CHANG, M.R.; CARVALHO, N.C.P.; OLIVEIRA, A.L.L.; MONCADA, P.M.F.; MORAES, B.A.; ASENSI M.D. **Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil**. Braz. J. Infect. Dis., v. 7, n. 2, p. 149-160, 2003.

CHEN, F.J.; HUANG, I.W.; WANG, C.H.; CHEN, P.C.; WANG, H.Y; LAI, J.F.; SHIAU, Y.R.; LAUDERDALE, T.L.Y. ***mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* with Low-Level Oxacillin MIC in Taiwan**. J. Clin. Microbiol. v. 50, n. 5, p. 1679-1683, 2012.

CHEN, X.; WANG, W.K.; HAN, L.Z.; LIU, Y.; ZHANG, H.; TANG, J.; LIU, Q.Z.; HUANGFU, Y.C.; NI, Y.X. **Epidemiological and Genetic Diversity of *Staphylococcus aureus* Causing Bloodstream Infection in Shanghai, 2009-2011**. Plos one, v. 8, n. 9, p. 1-7, 2013.

CHEN, J; LUO, Y; ZHANG, S; LIANG, Z; WANG, Y; ZHANG, Y; ZHOU, G; JIA, Y; CHEN, L; SHE, D. **Community-acquired necrotizing pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Pantone–Valentine leukocidin in a Chinese teenager: case report and literature review.** International Journal of Infectious Diseases, v. 26, p.17–21, 2014.

CHOU, Y.H.; LEE, M.S.; LIN, R.Y.; WU, C.Y. **Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections in outpatients in Taiwan.** Epidemiol. Infect., v. 143, n. 4, p. 749-753, 2015.

COHEN, M.L. **Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era.** Science, v. 257, p. 1050-1055, 1992.

COLLINS, J.; RUDKIN, J.; RECKER, M.; POZZI, C.; O'GARA, J.P.; MASSEY, R.C. **Offsetting virulence and antibiotic resistance costs by MRSA.** ISME Journal, v. 4, p. 577-584, 2010.

CRISOSTOMO, M.I.; WESTH, H.; TOMASZ, A.; CHUNG, M.; OLIVEIRA, D.C.; DE LANCASTRE, H. **The evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: similarity of genetics background in historically early methicillin-susceptible and resistant isolates and contemporary epidemic clones.** Proc. Natl. Acad. Sci., v. 98, p. 9865-9870, 2001.

CUI, L.; MURAKAMI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; HANAKI, H.; HIRAMATSU, K. **Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50.** Antimicrob. Agents Chemother, v. 44, p. 2276-85, 2000.

DAUM, R.S.; ITO, T.; HUSSAIN, F.; MONGKOLRATTANOTHAI, K.; JAMKLANG, M.; BOYLE-VAVRA, S. **A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds.** J. Infect. Dis., v. 186, p. 1344-1347, 2002.

DE ARAÚJO B.E.; BORCHERT, J.M.; MANHÃES, P.G.; FERREIRA, F.A.; RAMUNDO, M.S.; SILVA-CARVALHO, M.C.; SEABRA, A.C.; VICTAL, S.H.; FIGUEIREDO A.M.S.; **A rare cause of pyomyositis complicated by compartment syndrome caused ST30 staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Am. J. Emerg. Med., v. 28, p. 537, 2010.

DE KRAKER, M.E.; WOLKEWITZ, M.; DAVEY, P.G.; GRUNDMANN H. **Clinical Impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections.** Antimicrob. Agents Chemother., v.55, p.1598-605, 2011.

DELEO, F.R.; OTTO, M.; KREISWIRTH, B.N.; CHAMBERS, H.F. **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Lancet, v. 375, p. 1557-68, 2010.

DERESINSKI, S. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey.** Clin. Infect. Dis., v. 40, p. 562-573, 2005.

DEURENBERG, R.H. & STOBBERINGH, E.E. **The evolution of *Staphylococcus aureus*.** Infect. Genet. Evol., v. 8, n. 6, p. 747-63, 2008.

DOMINGUEZ, M.A.; DE LANCASTRE, H.; LIANRES, J.; TOMAZ, A. **Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in Spanish hospital.** J. Clin. Microbiol., v. 32, p. 2081-2087, 1994.

DONNIO, P.Y.; PRENEY, L.; GAUTIER-LERESTIF, A.L.; AVRIL, J.L.; LAFFORGUE, N. **Changes in staphylococcal cassette chromosome type and antibiotic resistance profile in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a French hospital over an 11 year period.** J. Antimicrob. Chemother., v. 538, p. 08-13, 2004.

ENRIGTH, M.C.; DAY, N.P.; DAVIES, C.E.; PEACOCK, S.J; SPRATT, B.G. **Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus***. J. Clin. Microbiol., v. 38, p. 1008-1015, 2000.

FEIL, E.J.; COOPER, J.E.; GRUNDMANN, H.; ROBINSON, D.A; ENRIGHT, M.C.; BERENDT, T. **How clonal is *Staphylococcus aureus*?** J. Bacteriol., v. 185, p. 3307-3316, 2003.

FIGUEIREDO, A.M.; FERREIRA, F.A. **The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., v. 109, n. 3, p. 265-278, 2014.

FINLAY, J.E.; MILLER, L.A.; POUPARD, J.A. **Interpretive criteria for testing susceptibility of staphylococci to mupirocin**. Antimicrob. Agents, v. 5, p 1137-1139, 1997.

FOSTER, T. J. & HOOK, M. **Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus***. Trends Microbiol., v. 6, p. 484-488, 1998.

FOSTER, T.J. **Immune evasion by Staphylococci**. Nature., v. 3, p. 948-958, 2005.

FRANCOIS, P.; HARBARTH, S.; HUYGHE, A.; RENZI, G.; BENTO, M.; GERVAIX, A.; PITTET, D.; SCHRENZEL, J.; **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Geneva, Switzerland, 1993-2005**. Emerg. Infect. Dis., 14, 304-307, 2008

FRIDKIN, S.K. **Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001**. Clin. Infect. Dis., v. 36. p. 429-439, 2003.



GALES, A.C.; SADER, H.S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A.C. **Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolates in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008).** Clin. Infect. Dis., v. 13, p. 90-98, 2009.

GARCIA-ALVAREZ, L. HOLDEN, M.T.; LINDSAY, H.; WEBB, C.R.; BROWN, D.F.; CURRAN, M.D. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study.** Lancet. Infect. Dis., v. 11, p. 595-603, 2011.

GARZONI, C. & KELLEY, W. L. ***Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence.** Trends Microbiol., v. 17, p. 59-65. 2009.

GELATTI, *et al.* **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type IV in southern Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 46, n. 1, p. 34-38, 2013.

GHUYSEN, J.M. **Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases.** Trends. Microbiol., v. 2, p. 372-380, 1994.

GILLET, Y; ISSARTEL, B; VANHEMS, P. *et al.*, **Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia BioMed Research International 7 in young immunocompetent patients.** The Lancet, v. 359, n. 9308, p. 753–759, 2002.

GORBACH, S.L. **Antimicrobial resistance in the 1990s.** Infect. Dis. Clin. Prac., v. 5, p. 32-36, 1996.

GORDON, R.L. & LOWY, F.D. **Pathogenesis of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Infection.** Clin Infect Dis., v. 46, n. 5, p. 350–359, 2008

GOSBELL, I. B. **Diagnosis and management of catheter-related bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus*.** Intern Med J, v. 35, p. 45-62, 2005.

GREEN, B.N.; JOHNSON, C.D.; EGAN, J.T.; ROSENTHAL M.; GRIFFITH, E.A.; EVANS, M.W. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists.** J. Chiropr. Med. v. 11, n. 1: p. 64-76, 2012.

GREENE, C.; MCDEVITT, D.; FRANCOIS, P.; VAUDAUX, P.; LEW D.P.; FOSTER, T.J. **Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on expression of *fnb* genes.** Mol. Microbiol., v. 17, p. 1143-1152, 1995;

GROOM, A.V.; WOLSEY, D.H.; NAIMI, T.S.; SMITH, K.; JOHNSON, S.; BOXRUD, D.; MOORE, K.A.; CHEEK, J.E. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rural Amerca Indian community.** JAMA, v. 286, p. 1201-1205, 2001.

GROTHER, C.; BELASCO, A.G.S.; BITTENCOURT, A.R.C.; VIANNA, L.A.C.; SESSO, R.C.C.; BARBOSA, D.A. **Incidência de infecção da corrente sanguínea nos pacientes submetidos à hemodiálise por cateter venoso central.** Rev. Latino-Am. Enfermagem, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2010.

GRUNDMANN, H.; AANENSEN, D.M.; VAN DEN WIJNGAARD, C.C.; SPRATT, B.G.; HARMSSEN, D.; FRIEDRICH, A.W. **Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis.** PLoS Med., v. 7, n.1, p. 1-15, 2010.

GRUNDMANN, H.; AIRES DE SOUZA, M.; BOYCE, J.; TIEMERSMA, E. **Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat.** Lancet., v. 368, p. 874-885, 2006.

GUIMARÃES, A.C; DONALISIO, M.R.; SANTIAGO, T.H.R.; FREIRE, J.B. **Óbitos associados à infecção hospitalar, ocorridos em um hospital geral de Sumaré-SP, Brasil.** Rev. Bras. Enferm., v. 64, n. 5, p. 864-869, 2011.

GUIMARÃES, M.A.; RAMUNDO, M.S.; AMÉRICO, M.A.; DE MATOS, M.C.; SOUZA, R.R.; RAMOS-JÚNIOR, E.S.; COELHO, L.R.; MORROT, A.; MELO, P.A.; FRACALANZZA, S.E.L.; FERREIRA, F.A.; FIGUEIREDO, A.M.S. **A comparison of virulence patterns and in vivo fitness between hospital- and community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* relates to the USA400 clone.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis., 2014.

HANAKI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S.; LABISCHINSKI, H.; HIRAMATSU, K. **Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50.** J. Antimicrob. Chemother. v. 42, p. 199-209, 1998.

HENNEKINNE, J.A.; DE BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. ***Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation.** FEMS Microbiol. Rev., v. 36, p. 815–836, 2012.

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KUROD, M.; ITO, T. **The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Trends Microbiol., v. 9, p. 486-493, 2001.

HIRAMATSU, K.; HANAKIA, H.; INOB, T.; YABUTAB, K.; OGURIC, T.; TENOVER, F.C. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility.** J. Antimicrob. Chemother., v. 40, p. 135–136, 1997.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMOTO, K.; TIENSASITORN, C.; HIRAMATSU, K. **Structural comparison of three types of staphylococcal cassettes chromossome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrob. Agents Chemother., v. 45, p. 1323 – 1336, 2001.

ITO, T.; OKUMA, K.; MA, X.X.; YZUAWA, H.; HIRAMATSU, K. **Insights on antibiotic resistance of *staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC**. Drug. Resist. Updat., v. 6, p. 41-52, 2003

ITO, T.; MA, X.X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YZUAWA, H.; HIRAMATSU, K. **Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC***. Antimicrob. Agents Chemother., v. 48, p. 2637-2651, 2004.

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZNE, S.; OONO, T. **Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression**. J. Dermatol. Sci., v. 42, p. 203-14, 2006.

JEVONS, M.P. **“Celbenin”-resistant staphylococci**. Br. Med. J., v. 1, p. 124-125, 1961.

JIMENÉZ, J.N.; OCAMPO, A.M.; VANEGAS, J.M.; RODRÍGUEZ, E.A.; GARCÉS, C.G.; PATIÑO, L.A.; OSPINA, S.; CORRÉA, M.M.; **Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a paediatric population in a university hospital of Medellín, Colombia**. Mem, Inst. Oswaldo Cruz, v. 106, n. 8, p. 980-985, 2011.

JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, E.P.; ASHTON, F.E.; POLLARD, D.R.; ROOZE, K.R. **Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction**. J Clin Microbiol., v. 29, n. 3, p. 426–430, 1991.

KANG, M.; KO, Y.; LIANG, X.; ROSS, C.; LIU, Q.; MURRAY, B. E.; HOOK, M. **Collagen-binding Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule (MSCRAMM) of Gram-positive Bacteria Inhibit Complement Activation via the Classical Pathway**. J. Biol. Chem., v. 288, p. 20520-20531, 2013.

KAPOOR, R.; , BARNETT, C.J.; GUTMANN, R.M.; YILDIZ, V.O.; JOSEPH, N.C.; STOICEA, N.; REYES, S.; ROGERS, B.M. **Preoperative prevalence of *Staphylococcus aureus* in cardiothoracic and neurological surgical patients.** *Frontiers in public health.* v. 2, n. 214, p. 1-4, 2014.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. **Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains:role os IS431 mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-leve methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p.1955-1963, 2001.

KIM, E.S.; SONG, J.S.; LEE, H.J.; CHOE, P.G.; PARK, K.H.; CHO, J.H.; PARK, W.B.; KIM, S.H.; BANG, J.H.; KIM, D.M.; PARK, K.U.; SHIN, S.; LEE, M.S.; CHOI, H.J.; KIM, N.J.; KIM, E.C.; OH, M.D.; KIM, H.B.; CHOE, K.W. **A survey of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea.** *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 60, p. 1108-1114, 2007.

KLEVENS, R.M.; EDWARDS, J.R.; TENOVER, F.C.; MCDONALD, L.C.; HORAN, T.; GAYNES, R. **Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992–2003.** *Clin. Infect. Dis.*, v. 42, p. 389–391, 2006.

KO, K.S.; LEE, J.Y.; SUH, J.Y.; OH, W.S.; PECK, K.R.; LEEN N.Y. **Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries.** *J. Clin.Microbiol.*, v. 43, p. 421-426, 2005.

LARSEN, A.; STEGGER, M.; GOERING, R.; SORUM, M.; SKOV R. **Emergence and dissemination of the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Denmark (2000–2005).** *Euro Surveill*, v. 12, n. 2, 2007.

LIM, D. & STRYNADKA, N.C. **Structutal basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Nat. Strict. Biol., v. 9, p. 870-876, 2002.

LIMA, D.F.L.; BRAZÃO, N.B.V.; FOLESCU, T.W.; NEVES, F.P.; FERREIRA, A.G.; SANTOS, E.A.; MARQUES, E.A; LEÃO, R.S. **Panton-Valentine leukocidin (PVL) gene carriage among *Staphylococcus aureus* strains with SCCmec types I, III, IV, and V recovered from cystic fibrosis pediatric patients in Brazil**. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 78, p. 59–62, 2014.

LIN, C.F.; CHEN, C.L.; HUANG, W.C.; CHENG, Y.L.; HSIEH, C.Y.; WANG, C.Y.; HONG, M.Y. **Different types of cell death induced by enterotoxins**. Toxins (Basel). v. 2, p. 2158–2176, 2010.

LINA, G.; PIÉMONT, Y.; GODALL-GAMOT, F.; BES, M.; PETTER, M. O.; GAUDUCHON, V.; VANDENESH, F. & ETIENNE J. **Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producins *Staphylococcus aureus* primary skin infections and pneumoniae**. Clin. Infect. Dis., v. 29, p. 1128-1132, 1999.

LPSN. **List of prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus***. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>>. Acessado em: 30 abr. 2015.

LOWY, F.D. **Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus***. J. Clin. Invest., v. 111, p. 1256-1273, 2003.

LOWY, F.D. **Medical PROGRESS: *Staphylococcus aureus* infections**. N. Engl. J. Med., v. 339, p. 520-532, 1998.

LUNA, C.M; NORIEGA, E.R; BAVESTRELLO, L.; GOTUZZO, E. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America**. Brazilian Journal Infection Disease, v.14, s.2, p 119-127, 2010.

MACHADO, D.P.; GOLDANI, L.Z.; PAIVA, R.M.; AQUINO, V.R.; DE-PARIS, F.; LISBOA, T.; JUNG, B.; SANTOS, R.P. **The impact of serum vancomycin levels and minimum inhibitory concentrations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on mortality in patients with nosocomial pneumonia.** J. Infect. Dis. Med. Microbiol., v. 24, n. 3, p. 75-79, 2013.

MARRA, A.R.; ALMEIDA, S.M.; CORREA, L. **The effect of limiting antimicrobial therapy duration on antimicrobial resistance in the critical care setting.** American Journal of Infection Control, v. 37, p. 204-209, 2009.

MARRA, A.R.; CAMARGO, L.F.A.; PIGNATARI, A.C.C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P.R.P.; MEDEIROS, E.A.S. **Nosocomial bloodstream infections in brazilian hospitals: bnalysis of 2,563 bases from a prospective nationwide surveillance study.** J. Clin. Microbiol., v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011.

MARTINS, A.; RIBOLI, D.F.M.; PEREIRA, V.C.; CUNHA, M.L. **Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian university hospital.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases., v. 18, n. 3, p. 331-335, 2014.

MEJÍA, C.; ZURITA, J.; GUZMÁN-BLANCO, M. **Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America.** Braz. J. Infect. Dis., v. 14, n. 2, p. 79–86, 2010.

MELO, G. B.; MELO, M.C.; CARVALHO, K.S.; GONTIJO FILHO, P.P. ***Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos resistentes à vancomicina em um Hospital Universitário Brasileiro.** Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 30, n. 1, p. 45-50, 2009.

MILHEIRICO, C.; OLIVEIRA, D.C.; LENCASTRE, H. **Uptade to the multipliex PCR Strategy for Assignmente of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 51, n. 9, p.3374-3377, 2007.

MOISE-BRODER, P. A.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G.M.; SCHENTAG, J.J.; FORREST, A.; MOELLERING, R.C.Jr. **Accessory gene regulator group ii polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy.** J. Clin. Infect. Dis, v. 38, n. 12, p. 1700-1705, 2004.

MONDAY, S.R. & BOHACH, G.A. **Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in *Staphylococcal* isolates.** J. Clin. Microbiol., v. 37, p. 3411-3414, 1999.

MONTANARO, L.; SPEZIALE, P.; CAMPOCCIA, D.; RAVAIOLI, S.; CANGINI, I.; PIETROCOLA, G.; GIANINI, S.; ARCIOLA, C.R. **Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics.** Future Microbiol., v. 6, p. 1329-1349, 2011.

MOODLEY, A.; OOSTHUYSEN, W.F.; DUSÉ, A.G.; MARAIS, E. **South Africa MRSA Surveillance Group. Molecular Characterization of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in South Africa.** J. Clin. Microbiol., v. 48, p. 4608-4611, 2010.

MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., KOBAYASHI, G.S., PFALLER, M.A. 2004. **Microbiologia Médica. In: *Staphylococcus e Microrganismos Relacionados* – 4<sup>a</sup> ed.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p.188-201.

NULENS, E.; BROEX, E.; AMENT, A.; DEURENBERG, R.H; SMEETS, E.; SCHERES, J.; VAN TIEL, F.H.; GORDTS, B.; STOBBERINGH, E.E. **Cost of the methicillin-resistans *Staphylococcus aureus* search and destroy policy in a Dutch university hospital.** J. Hosp. Infect., v. 68, p. 301-307, 2008.

NUNES, E.L.C; SANTOS, K.R.N; MODINO, P.J.J.; BASTOS, M.C.F; GIAMBIAGI-DE-MARVAL, M. **Detection of *ileS-2* Gene Encoding Mupirocin Resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Multiplex PCR.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis. v. 34, p. 77-81, 1999.



OGSTON, A.; ***Micrococcus* poisoning**. J. Anal. Physiol., v. 17, p. 24–58, 1883.

OKUMA, K.; IWAKAWA, K.; TURNIDGE, J.D.; GRUBB, W.B.; BELL, J.M.; O'BRIEN, F.G.; COOMBS, G.W.; PEARMAN, J.W.; TENOVER, F.C.; KAPI, M.; TIENSASITORN, C.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. **Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community**. J. Clin. Microbiol., v. 40, p. 4289-4294, 2002.

OLIVEIRA, D.C.; MILHEIRICO, C.; DE LANCASTRE, H. **Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCCmec type VI**. Antimicrob. Agents Chemother., v. 50, p. 3457-3459, 2006.

OLIVEIRA, D.C.; TOMASZ, A.; DE LANCASTRE, H. **Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Lancet Infect Dis., v. 2, n. 3, p.180-189, 2002.

OTTO, M. ***Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen**. Nat. Rev. Microbiol., 7, 555-567, 2009.

PALLIN, D.J.; EGAN, D.J.; PELLETIER, A.J.; ESPINOLA J.A.; HOOPER, D.C.; CAMARGO, JR. **Increased US emergency department visits for skin and soft tissue infections, and changes in antibiotic choices, during the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Ann. Emerg. Med., 51,291–298, 2008.

PALLIN, D.J.; EGAN, D.J.; PELLETIER, A.J.; ESPINOLA, J.A.; HOOPER, D.C.; CAMARGO Jr C.A. **Increased US emergency department visits for skin and soft tissue infections, and changes in antibiotic choices, during the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Ann. Emerg. Med., v. 51, p. 291-298, 2008.

PANIAGUA-CONTRERAS, G.L.; MONROY-PÉREZ, E.; PANIAGUA, F.V.; RODRÍGUEZ-MOCTEZUMA, J.R.; NEGRETE-ABASCAL, E.; VACA, S. **Implementation of a novel in vitro model of infection of reconstituted human epithelium for expression of virulence genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolates from catheter-related infections in Mexico.** Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, v. 13, n. 6, p. 1-9, 2014.

PARK, P. W.; ROSENBLOOM, J.; ABRAMS, W.; ROSENBLOOM, J., MECHAM, R. P. **Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (*ebpS*) in *Staphylococcus aureus*.** J. Biol. Chem., v. 271, p. 15803-15809, 1996.

PEACOCK, S.J.; MOORE, C.E.; JUSTICE, A.; KANTZANOU, M.; STORY, L.; MACKIE, K.; O'NEILL G.; DAY, N.P.J. **Virulent Combinations of Adhesion and Toxin Genes in Natural Populations of *Staphylococcus aureus*.** Infection and Immunity., v. 70, n. 9, p. 4987-4996, 2002.

PENA, D.R.; RODRIGUES, G.; KOBAYASHI, C.C.B.A.; VIEIRA, J.D.G.; SADOYAMA, G. **Perfil de resistência dos *Staphylococcus aureus* isolados de sangue e cateter.** ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, v.10, n.19; p. 388 – 396, 2014.

PEREIRA, V.; RIBOLI, D.; DA CUNHA, M. **Characterization of the clonal profile of MRSA isolates in neonatal and pediatric intensive care units of a University Hospital.** Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob., v. 13, n. 50, p. 1 - 6, 2014.

PITCHER, D.G.; SAUDERS, N.A.; OWEN, R.J. **Rapid Extraction of bacterial genomic DNA with guanidinium thiocyanate.** Lett. Appl. Microbiol., v. 8, p. 151-156, 1989.

PORTO, J.P.; SANTOS, R.O.; FILHO, P.P.G.; RIBAS, R.M. **Active surveillance to determine the impact of methicillin resistance on mortality in patients with bacteremia and influences of the use of antibiotics on the development of MRSA infection .** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 46, n. 6, p. 713-718, 2013.

PREVOST, G.; COUPPIE, P.; PREVOST, P. GAYET, S.; PETIAU, P.; CRIBIER, B.; MONTEIL, H. ; PIEMONT, Y. **Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins.** J. Med. Microbiol., v. 42, p. 237-245, 1995.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S.; Tecnologia Farmacêutica, 6ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2003.

RAGLE, B.E.; KARGINOV, V.A.; BUBECK, W.J. **Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* pneumonia with a beta-cyclodextrin derivative.** Antimicrob. Agents Chemother., v. 54, n. 11, p. 298–304, 2010.

RAMMELKAMP, C.H. & MAXON, T. **Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin.** Proc. Royal. Soc. Exper. Biol. Med., v. 51, p. 386-389. 1942.

RASMUSSEN, G.; MONECKE, S.; EHRLICH, R.; SÖDERQUIST, B. **Prevalence of Clonal Complexes and Virulence Genes among Commensal and Invasive *Staphylococcus aureus* Isolates in Sweden.** Plos One, v. 8, n. 10, p. 1-10 , 2013.

RIBEIRO, A.; CORONADO, A.Z.; SILVA-CARVALHO, M.C.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; DIAS, C.; ROZENBAUM, R.; DEL PELOSO, P.F.; LEITE, C.C.F.; TEIXEIRA, L.A.; FIGUEIREDO, A.M.S. **Detection and characterization international community-associated infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community and hospital-associated diseases.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis., v. 59, p. 339-345, 2007.

RIBEIRO, A.; SILVA-CARVALHO, M.C.; BERQUÓ, L.; FERREIRA, F.A.; SANTOS, R.N.S.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M.S. **First report of infection with community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America.** J. Clin. Microbiol., v. 43, p. 1985-1988, 2005.

ROBERTS, R.B.; CHUNG, M.; E LANCASTRE, A.; HARGRAVE, J.; TOMASZ, A.; NICOLAU, D.P.; JOHN, J.F.Jr.; KORZENIOWSKI, O. **Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey and Pennsylvania.** Microbial. Drug Resist., v. 6, p. 245-251, 2000.

ROBERTS, R.B.; TENNERBERG, A.M.; EISNER, W.; HARGRAVE, J.; DRUSIN, L.M.; YURT, R.; KREISWIRTH, B.N. **Outbreak in a New York teaching hospital burn center caused by Iberian epidemic clone of MRSA.** Microbial. Drug Resist., v. 4, p. 175-183, 1998.

ROBINSON, D.A. & ENRIGHT, M.C. **Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrob. Agents Chemother., v. 47, p. 3926-3934, 2003.

RODRIGEZ-NORIEGA, E.; SEAS, C.; GUZMÁN-BLANCO, M.; MEJÍA, C.; ALVAREZ, C.; BAVESTRELLO, L. **Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America.** Int. J. Infect Dis., v. 14, p. 560-566, 2010.

RODRIGUES, M.V.; FORTALEZA, C.M.; RIBOLI, D.F.; ROCHA, R.S.; ROCHA, C.; CUNHA, M.L. **Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn unit from Brazil.** Burns, v. 39, p. 1242-1249, 2013.

RODRIGUEZ, E.K.; CORREA, M.M.; OSPINA, S.; SANTIAGO L.; ATEHORTU, S.L.; JIMENEZ, N.J. **Differences in Epidemiological and Molecular Characteristics of Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus* (MSSA-MRSA) in Children from a University Hospital and Day Care Centers.** Plos One, v. 9, n. 7, p. 01-12, 2014.

ROSS, T.L. ; FUSS, E.P. ; HARRINGTON, S.M. ; CAI, M. ; PERL, T.M. ; MERZ, W.G. **Methicillin-Resistant *Staphylococcus caprae* in a neonatal intensive care unit.** J. Clin. Microbiol., v. 43, n. 1, p. 363-367, 2005.

ROSSI, F. **The challenges of antimicrobial resistance in Brazil.** Clin. Infect. Dis., v. 52, n. 9, p.1138-1143, 2011.

ROSSI, F.; DIAZ, L.; WOLLAM, A.; PANESSO, D.; ZHOU, Y.; RINCON, S.; NARECHANIA, A.; XING, G.; DI GOIA, T.S.R; DOI, A.; TRAN, T.T.; REYES, J.; MUNITA, J.M.; CARVAJAL, L.P.; HERNANDEZ-ROLDAN, A.; BRANDÃO, D.; DER HEIJDEN, I.M.V .; MURRAY, B.E.; PLANET, P.J.; WEINSTOCK, G.M.; CESAR, A.A. **Transferable Vancomycin Resistance in a Community-Associated MRSA Lineage.** N. Engl. J. Med., v. 370, n. 16, p. 1524-1531, 2014.

ROSSNEY, A.S.; SHORE, A.C.; MORGAN, P.M.; FITZGIBBON, M.M.; O'CONNELL, B.; COLEMAN, D.C. **The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Pantol-Valentine leukocidin gene (PVL) reveal that PVL is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland.** J. Clin. Microbiol., v. 45, p. 2554-2563, 2007.

ROZENBAUM, R.; SAMPAIO, M.G.; BATISTA, G.S.; GARIBALDI, A.M; TERRA, G.M.; SOUZA, M.J.; VIEIRA, E.N.; SILVA-CARVALHO, M.C.; TEIXEIRA, L.A; FIGUEIREDO, A.M.S. **First report in Brazil of severe infection cause by community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA).** Braz. J. Med. Biol. Res., v. 42, p. 756-760, 2009.

RUHE, J.J.; MENON, A. **Tetracyclines as an oral treatment option for patients with community onset skin and soft tissues infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrob. Agents. Chemother., v. 51, p. 3298-3303, 2007.

SABOUNI, F.; MAHMOUDI, S.; BAHADOR, A.; POURAKBARI, B.; SADEGHI, R.H.; ASHTIANI, M.T.; NIKMANESH, B.; MAMISHI, S. **Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* Isolates in an Iranian Referral Children's Hospital.** Osong Public Health Res Perspect, v. 5, n. 2, p. 96-100, 2014.

SÁ-LEÃO, R.; SANTOS, S.I.; DIAS, D.; PERES, I.; BARRO, R.M.; DE LANCASTRE, H. **Detection of archaic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain?** J. Clin. Microbiol., v. 37, p. 1913-1920, 1999.

SALGADO-PABON, W.; BRESHEARS, L.; SPAULDING, A.R.; MERRIMAN, J.A.; STACH, C.S.; HORSWILL, A.R.; PETERSON, M.L.; SCHLIEVERT, P.M. **Superantigens are critical for *Staphylococcus aureus* infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury.** mBio American Society for Microbiol., v.4, n. 4, p. 1-9, 2013.

SANCHES, I.S.; SARAIVA, Z.C.; TENDEIRO, T.C.; SERRA, J.M.; DIAS, D.C.; DE LANCASTRE, H. **Extensive intra-hospital spread of methicillin-resistant staphylococcal clone.** Int. J. Infect. Dis., v. 3, p. 26-31, 1998.

SANCHINI, A.; CAMPANILE, F.; MONACO, M.; CAFISO, V.; RASIGADE, J.P.; LAURENT, F. **DNA microarray-based characterisation of Panton–Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italy.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., v. 30, p. 1399–1408, 2011.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.G.; CASTRO, H.C. ***Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance.** J. Bras. Patol. Med. Lab. v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SCANVIS, A.; DENIC, L.; GAILLON, S.; GIRY, P.; ANDREMONT, A.; LUCET, J.C. **Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage.** Clin. Infect. Dis., v. 32, p. 1393-1398, 2001.

SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. **Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

SCHUENCK, R. P.; NOUER, S.A.; WINTER, C.A.; CAVALCANTI, F. S. ; SCOTTI, T. D.; FERREIRA, A.L.P. ; GIAMBIAGI-DE MARVAL, M. ; SANTOS, K.R.N. **Polyclonal presence of non-multiirresistant mehicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis., v. 64, p. 434-441, 2009.

SCHUENCK, R.P.; CAVALCANTE, F.S.; EMERY, E.; GIAMBIAGI-DE-MARVAL, M.; SANTOS, K.R.N. ***Staphylococcus aureus* isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence gene profiles.** Immunol. Med. Microbiol., v. 65, p. 501-504, 2012.

SHALLCROSS, L, J; FRAGASZY, E; JOHNSON, A, M; HAYWARD, A, C. **The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis.** The Lancet Infection Diseases, v. 13, n. 1, p. 43-54, 2013.

SIEVERT, D.M.; RUDRIK, J.T.; PATEL, J.B.; MCDONALD, L.C.; WILKINS, M.J.; HAGEMAN, J.C. **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006.** Clin. Infect. Dis., v. 46, p. 668-674, 2008.

SINA, H.; AHOYO, T.A.; MOUSSAOUI, W.; KELLER, D.; BANKOLÉ, H.S.; BAROGUI, Y.; STIENSTRA, Y.; KOTCHONI, S.O.; PRÉVOST, G.; BABA-MOUSSA, L. **Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolates from skin, soft tissue, and bone related infections.** BMC Microbiology, v. 13, n. 188, p 1-9, 2013.

SINGHAL, R ; MOHANTY, S.D.S.; DHAWAN, S.S.B.; DAS, B.; KAPIL, A. **Species distribution & antimicrobial susceptibility of coagulase negative *Staphylococci* in a tertiary care hospital.** Indian J. Med Res., v. 123, 569-570, 2006.

SINHA, B. & HERRMANN, M. **Mechanism ans consequences of invasion of endothelial cells by *Sthaphylococcus aureus*.** J . Thromb. Haemost., v. 94, p. 266-277, 2005.

SMELTZER, M. S., GILLAPSY, A. F., PRATT, F. L., THAMES, M. D. **Comparative evaluation of use of *cna*, *fnbA*, *fnbB*, and *hlb* for genomic fingerprinting in the epidemiological typing of *Staphylococcus aureus*.** Journal of Clinical Microbiology, v. 35, p. 2444-24449, 1997.

SMITH, T. & JARVIS, W. **Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*.** Microb. Infect., 1, 795-805, 1999.

SONG, J.H.; HSUEH, P.R.; CHUNG, D.R.; KO, K.S.; KANG, C.I.; PECK, K.R. **Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study.** J. Antimicrob. Chemother., v. 66, p. 1061–1069, 2011.

SRINIVASAN, A.; DICK, J. D.; PERL, T. M. **Vancomycine resistance in staphylococci.** Clin Microbiol Rev, v. 15, n. 3, p. 430-8, 2002.

STEFANI, S.; CHING, D.R.; LINDSAY, J.A.; FRIEDRICH, A.W.; KEARNS, A.M.; WESTH, H.; MACKENZIE, F.M. **Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods.** International Journal of Antimicrobial Agents., v. 39, p. 273-282, 2012.

STRUELENS, M.J.; HAWKEY, P.M.; FRENCH, G.L.; WITTE, W.; TACCONELLI, E. **Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs.** Clin. Microbiol. Infect., v. 15, p. 112–119, 2009.

SUPERSAC, G.; PREVOST, G.; PIEMONT, Y. **Sequencing of leukodisin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggest suggests that staphylococcal leukocidins and gamina-hemolysin are members of a single, two-component family of toxins.** Infect. Immun., v. 61, p. 580-587, 1993.



TAKANO, T.; HIGUCHI, W.; OTSUKA, T.; BARANOVICH, T.; ENANY, S.; SAITO, K.; ISOBE, H.; DOHMAE, S.; OZAKI, K.; TAKANO, M. **Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan.** Antimicrob. Agents Chemother., v. 52, p. 837-845, 2008.

TAYLOR, G.; BUSH, K.; LEAL, J.; HENDERSON, E.; CHUI, L.; LOUIE, M. **Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in Alberta, Canada.** J. Hosp. Infect., v. 89, n. 2, p. 132-135, 2015.

TEIXEIRA, L.A.; LOURENÇO, M.; FIGUEIREDO, A. **Emergence of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone related to the Brazilian epidemic clone III: causing invasive disease among AIDS patients in Brazilian hospital.** Microb. Drug. Resist., 2, 393-399, 1996.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; ARCHER, G.; BIDDLE, J.; BYRNE, S.; GOERING, R.; HANCOCK, G.; HEBERT, G.A.; HILL, B.; HOLLIS, R. **Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*.** J. Clin. Microbiol., v. 32, p. 407-415, 1994.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.F.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H. & SWAMINATHAN, B. **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.** J. Clin. Microbiol., v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TESTONI, F. MONTANARO, L.; POGGI, A.; VISAI, L.; CAMPOCCIA, D.; ARCIOLA, C.R. **Internalization by osteoblasts of two *Staphylococcus aureus* clinical isolates differing in their adhesion gene pattern.** Int. J. Artif. Organs., v. 34, p. 789-798, 2011.

TOKAJI, S. **New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in the Middle East.** Clin. Microbiol. Infect., v. 20, n. 7, p. 624-628, 2014.

TRISTAN, A.; YING, L.; BES, M.; ETIENNE, J.; VANDENESH, F. & LINA, G. **Use of multiplex PCR to identify *S. aureus* adhesions involved in human haematogenous infections.** J. Clin. Microbiol., v. 41, p. 4465-4467, 2003.

TRISTAN, A.; BES, M.; MEUGNIER, H.; LINA, G.; BOZDOGAN, B.; COURVALIN, P.; REVERDY, M.E.; ENRIGHT, M.C.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. **Global distribution of Panton-Valentine leukodocin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Emerg. Infect. Dis., v. 13, p. 594-600, 2007.

VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; KAUFMANN, M.E.; COOKSON, B.; FOREY, F.; ETIENNE, J.; GOERING, R.; TENOVER, F.; STEWARD, C.; O'BRIEN, F.; GRUBB, W.; TASSIOS, P.; LEGAKIS, N.; MORVAN, A.; EL SOLH, N.; DE RYCK, R.; STRUELENS, M.; SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; KOOISTRA, M.; WITTE, W.; VERBRUGH, H. **Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study.** J. Clin. Microbiol., v. 36, p. 1653-1659, 1998.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P.T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N.K.; FUSSING, V.; GREEN, J.; FEIL, E.; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S.; STRUELENS, M. **Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology.** Clin. Microbiol. Infect. v. 3, p. 01-46, 2007.

VANDENESH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M.C.; LINA, G.; NIMMO, G.R.; HEFFERNAN, H.; LIASSINE, N.; BES, M.; GREENLAND, T.; REVERDY, M.E.; ETIENNE, J. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panto-Valentine leukocodon genes: worldwide emergence.** Emerg. Infect. Dis., v. 9, p. 978-984, 2003.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. ***Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination.** Salud Pública del México, v. 47, p. 381-7, 2005.

VERKAIK, N.J.; DAUWALDER, O.; ANTRI, K.; BOUBEKRI, I.; DE VOGEL, C.P.; BADIOU, C.; BES, M.; VANDENESCH, F.; TAZIR, M.; HOOIJKAAS, H.; VERBRUGH, H.A.; VAN BELKUM, A.; ETIENNE, J.; LINA, G.; RAMDANI-BOUGUESSA, N.; VAN WAMEL, W.J. **Immunogenicity of Toxins during *Staphylococcus aureus* Infection.** Clin. Infect. Dis., v. 50, n. 1. p. 61-68, 2010.

VIVONI, A.M.; NETTO-DOS-SANTOS, K.R.; DE-OLIVEIRA, M.P.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; FERREIRA, A.L.P.; RILEY, L.W. & MOREIRA, B.M. **Mupirocin for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: lessons from a decade of use at a university hospital.** Infect. Control. Hosp. Epidemiol., v. 26, p. 662-667, 2005.

VIVONI, A.M.; DIEP, B.A.; MAGALHÃES, A.C.G. **Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates in Brazilian University Hospital: identification of international circulating lineages.** J. Clin. Microbiol. v. 44, p. 1686-1691, 2006.

WATERS, D.; JAWAD, I.; AHMAD, A.; LUKSIC, I.; NAIR, H.; THEODORATOU, E.; RUDAN, I.; ZAIDI, A.K.; CAMPBELL, H. **Aetiology of community-acquired neonatal sepsis in low and middle income countries.** J. Glob. Health. v.1, p. 154–170, 2011.

WEIGELT, J.; ITANI, K.; STEVENS, D.; LAU, W.; DRYDEN, M.; KNIRSCH, C. **Linezolid versus vancomycin in treatment of complicated skin and soft tissue infections.** Antimicrob Agents Chemother. v. 49, n.6, p. 2260-2266, 2005.

WILSON, G.J.; SEO, K.S. CARTWRIGHT, R.A.; CONNELLEY, T.; CHUANG-SMITH, O.N.; MERRIMAN, J.A.; GUINANE, C.M.; PARK, J.Y.; BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. **A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia.** PLoS Pathog., v. 7, n. 10, p. 1-16, 2011.

WISTREICH, 2011. Disponível em: <[http://www.microbeworld.org/index.php?option=com\\_jlibrary&view=article&id=7611](http://www.microbeworld.org/index.php?option=com_jlibrary&view=article&id=7611)>. Acesso em: 09 mar. 2015.

ZECCONI, A. & SCALI, F. ***Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases.** Immunol. Lett., v. 150, p. 12-22, 2013.